N° d'enregistrement au C.N.R.S. : A.O. 8286
Année 1973

T H È S E

présentée

AU CENTRE UNIVERSITAIRE DE MARSEILLE - LUMINY

UNIVERSITÉ D'AIX - MARSEILLE II

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES ENTOMOPOXVIRUS

par

Max BERGOIN

Soutenue le 6 Avril 1973 devant la Commission d'Examen.

JURY : MM. J.C. SENEZ — Président

A. LWOFF
C. VAGO
R. ROSSET
P. GEVAUDAN — Assesseurs

Station de Recherches Cytopathologiques INRA - CNRS

SAINT CHRISTOL - LES - ALÈS (GARD)

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545827_0003

N° d'enregistrement au C.N.R.S. : A.O. 8286
Année 1973

T H È S E

présentée

AU CENTRE UNIVERSITAIRE DE MARSEILLE - LUMINY
UNIVERSITÉ D'AIX - MARSEILLE II

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES ENTOMOPOXVIRUS

par

Max BERGOIN

Soutenue le 6 Avril 1973 devant la Commission d'Examen.

JURY : MM. J.C. SENEZ — Président
A. LWOFF
C. VAGO
R. ROSSET
P. GEVAUDAN — Assesseurs

Station de Recherches Cytopathologiques INRA - CNRS
SAINT CHRISTOL - LES - ALÈS (GARD)

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

UNIVERSITE D'AIX-MARSEILLE

U.E.R. EXPERIMENTALE ET PLURIDISCIPLINAIRE DE LUMINY

Président de l'Université d'Aix-Marseille : M.H. GASTAUD

Directeur de l'U.E.R. : M. MEBKHOUT

Secrétaire Général de l'Université : M.M. CONNAT

PROFESSEURS

MM.	A. ARAGNOL	Mathématiques
	H. BACRY	Physique théorique
	R. BUVAT	Cytologie et Biologie Végétale
	G. DUCET	Biologie
	D. KASTLER	Physique théorique
	H. MOREL	Analyse numérique
	J. PAILLARD	Psychophysiologie
	A. PENELOUX	Chimie
	G. RAUZY	Mathématiques
	J. RICARD	Physiologie végétale
	D. ROBINSON	Physique
	L. SAVIDAN	Chimie organique
	J.C. SENEZ	Microbiologie
	J. STARKA	Microbiologie

PROFESSEURS SANS CHAIRE ET MAITRES DE CONFERENCE

MM.	E. BIANCO	Mathématiques
	M. BIENFAIT	Physique
Mme	L. CARBONEL	Chimie
MM.	J. CARMONA	Mathématiques
	A. COLMERAUER	Mathématiques-Informatique
	J.M. DEBEVER	Physique
	C. FLORES	Psychologie
	J. HANUS	Physique
	B. MUNIER	Sciences économiques
Mme	A. PRELLER-ELLISON	Mathématiques
MM.	J.C. RISSET	Electrotechnique
	R. ROSSET	Chimie biologique
	Y. THOUVENY	Biologie
	G. WEISBUCH	Physique
	G. ZELLER-MEIER	Mathématiques

à la mémoire de mon père

et de mon fils Michel

- A V A N T - P R O P O S -

C'est avec plaisir que je remercie tous ceux qui m'ont encouragé et aidé dans la réalisation de ce travail.

Monsieur le Professeur Constant VAGO, Membre de l'Institut, m'a accueilli à la Station de Recherches Cytopathologiques de Saint-Christol et m'a orienté lors de mes débuts dans la Recherche. Il n'a cessé depuis de me prodiguer ses encouragements et ses conseils. Il est à l'origine de ce travail, l'a suivi et en a favorisé l'évolution. Je suis heureux de lui exprimer ici ma très sincère reconnaissance.

Monsieur le Professeur André LWOFF, Prix Nobel de Médecine, a accepté de me parrainer dans ces recherches. C'est un grand honneur pour moi de le compter parmi mes juges. Je lui suis infiniment reconnaissant pour l'attention bienveillante avec laquelle il m'a toujours reçu et conseillé. Je l'en remercie profondément et lui adresse l'expression de toute ma déférence.

Monsieur le Professeur Jacques C. SENEZ, Directeur du Laboratoire de Chimie Bactérienne du C.N.R.S. me fait l'honneur de présider ce Jury. Qu'il me soit permis de l'en remercier et de lui exprimer ma déférente gratitude.

J'adresse également mes respectueux et très vifs remerciements à Messieurs les Professeurs Roland ROSSET et Pierre GEVAUDAN qui ont accepté de faire partie de ce Jury et ont pris la peine de s'intéresser à mon travail à cette occasion.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Monsieur le Professeur Marcel ABELOOS qui a favorisé ma vocation de chercheur, par l'originalité et la valeur de son enseignement.

Je suis très redevable à mon ami Gérard DEVAUCHELLE, Maître-Assistant à l'Université de Picardie pour sa précieuse collaboration en microscopie électronique. Il est certain que sans son aide dans cette discipline, certains résultats présentés dans ce mémoire n'auraient pu voir le jour. Je remercie aussi très vivement mon ami René SCALLA, Chargé de Recherche à la Station de Physiopathologie de l'I.N.R.A., Dijon, de son efficace collaboration et de m'avoir initié aux techniques biochimiques.

Mes très vifs remerciements vont également à Monsieur Bernard HURPIN, Directeur de la Station de Recherches de Lutte Biologique de l'I.N.R.A., La Minière, et à Monsieur Pierre ROBERT de cette Station qui m'ont toujours approvisionné fort obligeamment en larves de hannetons.

Que mes collègues américains, les Docteurs Robert R. GRANADOS et Donald W. ROBERTS, du Boyce Thompson Institute for Plant Research, Yonkers, New-York, auprès desquels j'ai travaillé pendant un an sur l'entomopoxvirus d'Amsacta trouvent ici l'expression de ma sympathie. L'accueil chaleureux qu'ils m'ont réservé et les facilités qu'ils ont mises à ma disposition ont grandement contribué à rendre ce séjour agréable. J'ai eu la chance au cours de ce séjour de collaborer avec le Docteur Samuel DALES du Public Health Research Institute of the City of New-York et son équipe et de bénéficier ainsi de sa haute compétence dans le domaine des Poxvirus. Qu'il trouve ici l'expression de ma respectueuse gratitude.

Je dois au Docteur Karl MARAMOROSCH du Boyce Thompson Institute, l'invitation d'aller travailler aux Etats-Unis. Qu'il soit assuré de ma profonde reconnaissance pour m'avoir permis de faire cette expérience enrichissante à tous égards.

J'associe dans un même sentiment de sincère gratitude mes collègues de la Station de Saint-Christol et du Laboratoire de Pathologie Comparée de l'Université de Montpellier pour l'aide morale et matérielle qu'ils n'ont cessé de me prodiguer et leur esprit d'équipe. Faute de pouvoir les nommer individuellement, ils ne me tiendront pas rigueur de remercier plus particulièrement mes proches collaborateurs, Madame Charlette BENAU et Monsieur Jean-Claude VEYRUNES.

Je remercie enfin tous ceux qui ont participé à la réalisation matérielle de ce mémoire tant pour la dactylographie que l'iconographie et la duplication.

SOMMAIRE

	Pages
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : MATERIEL ET TECHNIQUES	5
I - LE MATERIEL VIVANT	5
A - Les larves de *Melolontha melolontha*	5
- *Cycle dans la nature*	5
- *Récolte des larves*	6
- *Maintien des larves au laboratoire*	6
- *Infections*	7
- *Contrôles après infections*	8
B - Les larves d'*Estigmene acrea*	9
- *Elevage*	9
- *Infections*	10
II - TECHNIQUES DE MICROSCOPIE	10
A - Microscopie photonique	10
B - Microscopie électronique à balayage	11
C - Microscopie électronique à transmission	11
- *Fixations et inclusions*	11
- *Colorations par les techniques classiques*	12
- *Techniques cytochimiques*	12
- *Digestions enzymatiques*	12
III - TECHNIQUES BIOCHIMIQUES	13
A - Dosages colorimétriques	13
- *ADN*	13
- *ARN*	14
- *Protéines*	14

Pages

B - Analyses qualitatives et quantitatives d'acides aminés 14

- *Hydrolyse acide* 14
- *Hydrolyse alcaline* 14
- *Chromatographie sur couches minces* 15
- *Chromatographie quantitative sur colonne* 15

C - Analyses et dosages spectrophotométriques 15

CHAPITRE II : L'ENTOMOPOXVIRUS DU COLEOPTERE *MELOLONTHA MELOLONTHA* 17

I - CARACTERES GENERAUX DE LA MALADIE 17

A - Origine 17

B - Symptômes 17

C - Histopathologie 18

D - Spectre d'hôtes 19

II - LES INCLUSIONS 20

A - Structure des inclusions 20

- *Observations au microscope photonique* 20
- *Observations des suspensions au microscope électronique à balayage* 22
- *Observations des coupes ultra-fines au microscope électronique* 23

B - Morphogénèse des inclusions 25

C - Discussion 26

D - Purification des inclusions 28

- *Purification du mélange fuseaux-sphérules* 28
- *Séparation des fuseaux et des sphérules* 29

E - Etude des caractères de solubilité des inclusions 29

- *Solvants organiques* 30
- *Enzymes protéolytiques* 30

Pages

- *Influence du pH* 30
- *Action des composés réducteurs en milieu alcalin* 31
- *Sucs digestifs de l'hôte* 31
- *Discussion* 33

F - Composition chimique des inclusions 35

- *Teneur en ARN et ADN* 35
- *Composition en acides aminés* 36
- *Etude dans l'ultra-violet des protéines de fuseaux et de sphérules* 38
- *Discussion* 40

G - Essais de pouvoir infectant des suspensions purifiées de fuseaux, de sphérules. Essais de toxicité de leurs protéines 45

- *Inclusions figurées* 45
- *Protéines d'inclusions* 46
- *Discussion* 46

H - Conclusions 48

III - LE VIRION 50

A - Structure du virion 50

- *Observation en contraste négatif* 50
- *Observation en coupes ultra-fines* 51
- *Etude cytochimique du virion* 54
- *Discussion* 55

B - Purification des virions 56

- *Purification des virions libres* 56
- *Purification des virions contenus dans les sphérules* 58
- *Critique des techniques de purification* 59

C - Caractérisation des suspensions virales 61

- *Spectre d'absorption dans l'ultra-violet* 61
- *Dosage de l'acide nucléïque et des protéines du virion* 61

Pages

- *Essais de virulence des virions purifiés à partir des sphérules* 63
- *Discussion* 65

IV - ETUDE ULTRASTRUCTURALE DU CYCLE DE MULTIPLICATION VIRALE DANS LES CELLULES DU TISSU ADIPEUX 66

A - Essais de multiplication du virus sur cultures de cellules *in vitro* 66

B - Conditions d'étude du cycle dans les cellules du tissu adipeux *in vivo* 68

C - Morphogénèse virale 69

D - Structures associées aux aires de virogénèse 70

E - Dissémination des virions 70

- *Expulsion des virions libres* 71
- *Inclusion des virions dans les sphérules* 71

F - Discussion 73

V - LES ALTERATIONS DES CELLULES DU TISSU ADIPEUX AU COURS DE L'INFECTION VIRALE 74

A - Ultrastructure des cellules saines 75

B - Ultrastructure des cellules infectées 76

C - Discussion 77

CHAPITRE III : L'ENTOMOPOXVIRUS DU LEPIDOPTERE *AMSACTA* 81

I - CARACTERES GENERAUX DE LA MALADIE CHEZ LE LEPIDOPTERE *ESTIGMENE ACREA* 81

A - Origine 81

B - Symptômes et histopathologie 81

C - Spectre d'hôtes 82

Pages

II - LES INCLUSIONS 83

A - Structure des inclusions 83

B - Purification des inclusions 83

- *Technique de purification* 83
- *Problèmes posés par la contamination des suspensions par des inclusions d'autres virus* 84

C - Etude des conditions de solubilisation des inclusions 85

- *Influence du pH* 85
- *Action des solvants organiques* 86
- *Action des composés réducteurs en milieu alcalin* 86
- *Action des sucs digestifs de l'hôte* 87

D - Composition chimique des inclusions 87

- *Teneur en ARN et ADN* 87
- *Teneur en protéines* 88
- *Spectre dans l'ultra-violet de la fraction protéinique des inclusions* 88

E - Discussion 89

III - LE VIRION 91

A - Purification des virions 91

- *Purification des virions libres* 91
- *Purification des virions par dissolution des inclusions* 91

B - Structure du virion en contraste négatif 92

C - Etude de quelques propriétés de suspensions virales purifiées 93

- *Spectre d'absorption dans l'ultra-violet* 93
- *Teneur en ADN et protéines du virion* 93
- *Discussion* 94

Pages

D - Essais d'isolement de l'acide nucléique viral 95

- *Techniques d'extraction* 95
- *Résultats* 96
- *Discussion* 97

E - Mise en évidence d'activités enzymatiques dans le virion 99

- *Nucléotide phosphohydrolase* 99
- *Désoxyribonucléases acide et neutre* 101
- *ARN polymérase* 102
- *Discussion* 102

CHAPITRE IV : COMPARAISON ENTRE LES ENTOMOPOXVIRUS 105

I - INTRODUCTION 105

II - LES ENTOMOPOXVIRUS DE COLEOPTERES 106

A - L'entomopoxvirus d'*Othnonius batesi* 106

B - L'entomopoxvirus de *Dermolepida albohirtum* 107

C - L'entomopoxvirus de *Demodena boranensis* 107

D - L'entomopoxvirus de *Phyllopertha horticola* 108

E - L'entomopoxvirus de *Figulus sublaevis* 108

F - L'entomopoxvirus de *Geotrupes silvaticus* 110

G - Discussion 110

III - LES ENTOMOPOXVIRUS DE LEPIDOPTERES 112

A - L'entomopoxvirus d'*Operophtera brumata* 112

B - L'entomopoxvirus d'*Acrobasis zelleri* 112

C - L'entomopoxvirus d'*Oreopsyche angustella* 113

D - L'entomopoxvirus de *Choristoneura biennis* 114

E - L'entomopoxvirus d'*Euxoa auxiliaris* 114

F - Discussion 115

Pages

IV - LES ENTOMOPOXVIRUS D'ORTHOPTERES 116

A - L'entomopoxvirus de *Melanoplus sanguinipes* 116

B - Discussion 117

V - LES ENTOMOPOXVIRUS DE DIPTERES 117

A - L'entomopoxvirus de *Camptochironomus tentans* 117

B - L'entomopoxvirus de *Chironomus luridus* 118

C - L'entomopoxvirus de *Chironomus attenuatus* 120

D - Discussion 120

VI - CONCLUSIONS 120

CHAPITRE V : COMPARAISONS ENTRE POXVIRUS DE VERTEBRES ET D'INVERTEBRES 129

I - MORPHOLOGIE ET STRUCTURE DES VIRIONS 129

A - Généralités 129

B - L'enveloppe 131

- *Définition des formes "M" et "C"* 131
- *Ornementation de la surface du virion* 133
- *Structure de l'enveloppe* 135

C - Le nucléoïde 136

- *Problème de terminologie* 136
- *La coque du nucléoïde* 137
- *Structure interne du nucléoïde* 139

D - Les corps latéraux 142

E - Nature chimique des constituants du virion 143

- *L'enveloppe* 143

Pages

- *Les corps latéraux et la coque du nucléoïde* 144
- *L'intérieur du nucléoïde* 144

II - COMPOSITION CHIMIQUE 146

A - Analyse globale 146

B - L'acide nucléique 146

C - Les protéines 147

III - SEROLOGIE 148

A - Les antigènes solubles 148

B - Les antigènes extraits des virions purifiés 148

C - Relations sérologiques entre antigènes solubles et antigènes extraits des virions purifiés 150

D - Relations sérologiques entre poxvirus de vertébrés 150

E - Relations sérologiques entre poxvirus de vertébrés et d'invertébrés 151

IV - CYCLE DE REPLICATION VIRALE 151

A - Pénétration des virions 152

B - Début des synthèses virales 153

C - Morphogénèse virale 155

D - Dissémination des virions 160

V - CONCLUSIONS 163

RESUME ET CONCLUSIONS 171

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 183

ANNEXE BIBLIOGRAPHIQUE 213

PLANCHES HORS TEXTE I à LIX

- INTRODUCTION -

Pendant de nombreuses années et jusqu'à une époque récente, les seuls virus pathogènes pour les insectes qui aient fait l'objet de recherches suivies furent les agents des maladies connues sous les noms de polyédroses nucléaires et de granuloses. Ces virus, bacilliformes et contenant de l'ADN, possèdent en commun la propriété de s'incorporer à la fin de leur cycle dans des inclusions protéiniques cristallines appelées respectivement polyèdres et granules facilement identifiables au microscope photonique.

L'intérêt particulier porté à ces virus dès la fin du siècle dernier s'explique en grande partie par l'importance économique des insectes utiles ou nuisibles qu'ils parasitent, tels les lépidoptères producteurs de la soie naturelle ou défoliateurs des cultures et des forêts. La polarisation des recherches sur ce groupe particulier de virus dont on ne connaît par ailleurs d'équivalent ni chez les animaux supérieurs ni chez les plantes, et l'importance parfois exagérée attribuée aux inclusions qu'ils engendrent, ont contribué à entretenir dans l'esprit de nombreux virologues l'idée selon laquelle les virus d'insectes diffèrent fondamentalement de ceux parasitant les autres organismes.

La mise en évidence au cours de la dernière décade d'un grand nombre de virus entomopathogènes n'appartenant pas au groupe des virus mentionnés ci-dessus et leur caractérisation morphologique et biochimique ont modifié de façon radicale les conceptions antérieures. Ces travaux ont en particulier fait apparaître de nombreuses ressemblances entre certains de ces virus et ceux décrits chez les bactéries, les végétaux, les vertébrés ou l'homme. Ainsi, ces travaux ont-ils contribué à rompre les barrières artificielles dressées entre les différentes disciplines de la virologie et ont favorisé du même coup le courant général d'idées qui a conduit au concept actuel de la virologie comparée.

La découverte chez les insectes de maladies ayant pour agents des virus ressemblant aux poxvirus, connus alors seulement chez les vertébrés, constitue l'une des illustrations les plus marquantes de cette ouverture de la pathologie virale des insectes sur la virologie comparée.

On doit à HURPIN et VAGO la description en 1963 du premier cas de maladie d'insecte due à un virus de ce type, chez la larve du hanneton commun, le coléoptère *Melolontha melolontha* L. La même année, VAGO démontrait la nature virale de l'agent causal et reconnaissait ses affinités avec les virus du groupe des poxvirus.

A la suite de cette découverte, plusieurs virus de ce type ont été reconnus chez différents insectes et l'on connaît à l'heure actuelle une vingtaine de souches isolées en différents points du globe. Ces virus, que nous nommerons entomopoxvirus, possèdent comme beaucoup d'autres virus entomopathogènes, la propriété de s'incorporer à la fin de leur cycle dans des inclusions désignées ici par les noms de sphérules, sphéroïdes ou corps ovoïdes. Certains entomopoxvirus, dont celui de *Melolontha*, ont en outre la propriété d'induire dans les cellules qu'ils infectent la synthèse d'un deuxième type d'inclusions, dépourvues de virions, nommées fuseaux à cause de leur forme.

Nos propres recherches concernent l'étude de deux de ces agents, l'entomopoxvirus du coléoptère *Melolontha melolontha* et celui de l'entomopxvirus du lépidoptère *Amsacta moorei*.

Dans un premier chapitre, nous présenterons brièvement les caractéristiques du matériel vivant, des larves d'insectes, sur lequel nous avons travaillé. En l'absence de système cellulaire *in vitro* comparable à celui dont disposent les virologues de vertébrés, tous nos résultats reposent en effet sur des expériences faites *in vivo*. Les techniques de microscopie et de biochimie mises en oeuvre dans ce travail seront également exposées dans ce chapitre. Les techniques développées au cours de nos recherches pour résoudre certains problèmes plus spécifiques seront exposées dans les deux chapitres suivants.

Le second chapitre sera consacré à l'étude de l'entomopxvirus

de *Melolontha*. Après un bref exposé des caractéristiques de la maladie, nous examinerons la structure, la purification, les caractères de solubilité et la composition chimique des inclusions, sphérules et fuseaux, présentes dans les cellules infectées. Ces données seront comparées à celles de la littérature sur des inclusions semblables associées ou non à des phénomènes pathologiques.

L'étude ultrastructurale du virion par différentes techniques cytologiques et cytochimiques fera l'objet d'une autre section, et nous permettra de proposer un modèle. Nous présenterons ensuite nos résultats de purification et de caractérisation physique, chimique, biologique des suspensions virales purifiées.

L'étude ultrastructurale de la morphogénèse virale dans les cellules du tissu adipeux de l'hôte sera présentée dans la section suivante.

Nous examinerons enfin les altérations cellulaires consécutives à l'infection virale telles que nous les avons observées en ultrastructure sur coupes ultrafines de cellules du tissu adipeux.

L'étude de l'entomopoxvirus d'*Amsacta* fera l'objet du chapitre suivant. Nous rappellerons tout d'abord les caractéristiques de la maladie telle que l'ont décrite originellement ROBERTS et GRANADOS en 1968, sur l'hôte de remplacement, le lépidoptère américain *Estigmene acrea*. La purification des inclusions de type sphérules, seules présentes dans cette maladie, l'étude des conditions de leur solubilisation et leur analyse chimique partielle feront l'objet de la section suivante. Nous examinerons ensuite la purification et quelques propriétés de ce virus. Ces résultats seront comparés à ceux obtenus lors de l'étude de l'entomopoxvirus de *Melolontha*.

Nous terminerons ce chapitre par l'exposé de deux aspects particuliers que nous avons spécialement étudiés chez ce virus, celui de l'essai d'isolement de l'acide nucléique et de la mise en évidence d'activités enzymatiques dans le virion.

Dans le quatrième chapitre, nous comparerons entre eux tous les entomopoxvirus décrits à ce jour ainsi que les maladies qu'ils provoquent

chez leurs hôtes respectifs. Bien que les données dont nous disposons concernant les entomopoxvirus autres que ceux de *Melolontha* et d'*Amsacta* soient encore très fragmentaires, nous verrons qu'il est possible dès à présent de distinguer parmi ces virus différents types morphologiques.

Le dernier chapitre aura pour objet la comparaison entre poxvirus de vertébrés et entomopoxvirus. Etant donné le caractère fragmentaire de nos connaissances sur les agents d'invertébrés par rapport à l'imposante somme de connaissances acquises pour les agents de vertébrés, nous limiterons l'exposé sur ces derniers aux seuls points pouvant être valablement comparés. Nous nous efforcerons enfin, en conclusion, de mettre en relief les affinités existant entre poxvirus de vertébrés et entomopoxvirus et les originalités que présentent ces derniers.

Ces comparaisons nous amèneront à discuter la nomenclature des agents d'invertébrés et à proposer l'élargissement de la Famille des *Poxviridae* telle qu'elle est définie dans le système de classification LHT.

CHAPITRE I

- MATERIEL ET TECHNIQUES -

Pages

I - LE MATERIEL VIVANT 5

A - Les larves de *Melolontha melolontha* 5

1 - Cycle dans la nature 5
2 - Récolte des larves 6
3 - Maintien des larves au laboratoire 6
4 - Infections 7
a - Inoculations 7
b - Ingestions forcées 7
5 - Contrôles après infections 8

B - Les larves d'*Estigmene acrea* 9

1 - Elevage 9
2 - Infections 10

II - TECHNIQUES DE MICROSCOPIE 10

A - Microscopie photonique 10

B - Microscopie électronique à balayage 11

C - Microscopie électronique à transmission 11

1 - Fixations et inclusions 11
2 - Colorations par les techniques classiques 12
3 - Techniques cytochimiques 12
4 - Digestions enzymatiques 12

Pages

III - TECHNIQUES BIOCHIMIQUES 13

A - Dosages colorimétriques 13

1 - ADN 13
2 - ARN 14
3 - Protéines 14

B - Analyses qualitatives et quantitatives d'acides aminés 14

1 - Hydrolyse acide 14
2 - Hydrolyse alcaline 14
3 - Chromatographie sur couches minces 15
4 - Chromatographie quantitative sur colonne 15

C - Analyses et dosages spectrophotométriques 15

CHAPITRE I

- MATERIEL ET TECHNIQUES -

Dans la première partie de ce chapitre nous décrivons les conditions d'élevage et d'infection des larves d'insectes utilisées dans nos travaux, tandis que la deuxième partie est consacrée à l'exposé des techniques de microscopie et de biochimie. Les méthodes développées au cours de nos recherches, telles les méthodes de purification des inclusions et des virions, seront exposées avant les résultats.

I - LE MATERIEL VIVANT

A - Les larves de *Melolontha melolontha*

Afin de mieux comprendre certains problèmes posés par l'expérimentation sur les larves de *Melolontha melolontha* L., il nous paraît souhaitable de présenter rapidement le cycle de cet insecte dans la nature.

1 - Cycle dans la nature

Sans entrer dans les détails du cycle assez complexe du hanneton commun, nous commenterons brièvement le schéma qu'en donne HURPIN (1962) dans une revue détaillée sur la biologie et l'écologie de cet insecte (Pl. I, Fig. 1). Le cycle s'échelonne sur une durée de trois ans et se décompose approximativement en 25 mois de vie larvaire, 2 mois de vie nymphale et 9 mois de vie imaginale. A l'exception de 4 à 6 semaines de vie épigée, au stade adulte, le cycle s'effectue sous terre. La vie larvaire se décompose elle-

même en 3 stades désignés par les symboles L_1, L_2 et L_3. Au cours de leur vie, les larves effectuent deux migrations verticales descendantes, à l'automne de la première et de la deuxième année et deux migrations ascendantes, au printemps de la deuxième et de la troisième année.

2 - *Récolte des larves*

Etant donné la complexité et la longueur du cycle naturel du hanneton commun, l'élevage complet, de l'oeuf à l'adulte, s'avère difficile et peu rentable à grande échelle bien qu'expérimentalement réalisable (HURPIN, 1964). Il est par contre relativement facile de récolter des larves dans leur milieu naturel. C'est ainsi que toutes les larves que nous avons utilisées provenaient de récoltes effectuées dans différentes régions de France où cet insecte est particulièrement abondant (*). Les récoltes ont lieu au moment des labours, au début (stade L_2) ou à la fin (stade L_3) de la deuxième année du cycle.

3 - *Maintien des larves au laboratoire*

La technique de maintien des larves au laboratoire est pour l'essentiel comparable à celle décrite par ROBERT (1967). Les larves sont placées à la température de 20°C, individuellement dans des boîtes cylindriques en polystyrène (Ø 5 cm, h 4 cm) contenant de la sciure de peuplier décomposée, tamisée et préalablement stérilisée par autoclavage. Elles sont nourries de rondelles de carottes. Chaque semaine les larves sont transférées dans des boîtes désinfectées, le milieu et la nourriture sont renouvelés. Ces conditions permettent de maintenir à un niveau très bas le taux de mortalité dû à la contamination par certains germes, surtout des champignons appartenant aux genres *Beauveria* et *Metarrhizium*.

Les larves en réserve sont conservées à la température de 5°C dans des boîtes à casiers contenant de la sciure. Elles sont transférées à la

---

(*) Elles nous ont été aimablement fournies par la Station de Recherches de Lutte Biologique de la Minière, I.N.R.A., Versailles.

température de 20°C au moins deux jours avant leur utilisation.

4 - *Infections*

Dans la mesure du possible, nous avons utilisé des larves de stade L_3 ayant subi la deuxième mue depuis moins de deux mois. Ces conditions permettent de travailler avec des larves plus résistances aux manipulations que celles de stade L_2 et de disposer d'un temps suffisant pour que la maladie s'établisse bien avant la nymphose.

a - Inoculations

Les infections de routine sont réalisées par inoculation dans la cavité viscérale des larves d'un broyat infectieux de tissu adipeux prélevé aseptiquement. Ce broyat est préparé de la façon suivante : on fixe une larve sur une planche à dissection, côté ventral en haut, à l'aide d'une aiguille plantée dans la capsule céphalique. On maintient la larve en position étirée à l'aide d'une paire de pinces. La cuticule est nettoyée avec un coton imprégné d'alcool à 95°, flambée et incisée de l'extrémité du pygidium aux pièces buccales. On ouvre ensuite latéralement et les volets rabattus sont maintenus par des épingles. Le tissu adipeux est alors prélevé avec des pinces courbes en prenant soin de ne pas crever la paroi intestinale. Les fragments de tissu sont recueillis dans un broyeur Potter stérile, maintenu à 0°C dans la glace fondante contenant de l'eau physiologique ou du tampon ascorbate - Tris 0,1 M pH 7,45. L'emploi de la glace et de l'acide ascorbique a pour but d'éviter la mélanisation très rapide à température ordinaire et au contact de l'air. Le tissu adipeux de deux larves infectées depuis environ 2 mois est généralement mélangé et broyé dans 10 ml de liquide, à la main, jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène. La suspension est alors transférée dans un tube stérile. Après décantation le surnageant est utilisé directement pour les inoculations. Les inoculations sont faites à l'aide d'un micro-injecteur Braun équipé d'une seringue à insuline de 1 ml avec aiguille 15/4. Le tégument de la larve est désinfecté au niveau de la région à piquer avec un coton imprégné d'alcool à 95°.

Les inoculations de suspensions purifiées de virions, d'inclusions et de protéines d'inclusions ainsi que celles d'eau physiologique

stérile pratiquées sur les larves des lots témoins sont réalisées de la même manière. Quel que soit le matériel inoculé son volume est toujours de 0,1 ml/ larve.

b - Ingestions forcées

Nous avons aussi réalisé dans certains cas des infections *per os* simulant les conditions naturelles d'infection. On utilise alors des seringues munies d'aiguilles plus longues (30/6) dont le bout est rodé par usure sur une surface abrasive. L'aiguille est introduite délicatement entre les pièces buccales de la larve et enfoncée d'environ 5 mm dans la lumière intestinale. Le volume introduit est le même que celui inoculé (0,1 ml) mais la fraction effectivement ingérée varie par suite de régurgitation chez certains individus.

Les larves inoculées ou infectées *per os* sont placées dans des boîtes dont le fond est muni de deux épaisseurs de papier Joseph et laissées sans nourriture ni sciure pendant 24 heures. On prévient ainsi l'infection par blessure au niveau de la piqûre et l'on peut contrôler les mortalités dues soit à des contaminations des suspensions inoculées soit à la perforation de la paroi intestinale lors des ingestions forcées.

5 - *Contrôles après infections*

Le contrôle des larves a lieu chaque semaine, lors du renouvellement de la nourriture. Toute larve trouvée morte à cette occasion est disséquée et la recherche de germe effectuée sur frottis colorés au bleu de méthylène de Loëffler. Le critère de l'infection virale que nous avons utilisé dans toutes nos expériences est la présence ou l'absence d'inclusions (fuseaux et sphérules) sur frottis ou suspensions de tissu adipeux. On sait en effet qu'à 20°C toute larve L_3 infectée avec une quantité de matériel virulent entraînant 100 % de mortalité possède ces inclusions après environ 2 mois. Pour la production massive d'inclusions on attend que les symptômes de la maladie soient nets (4 à 6 mois) et on dissèque les larves pour en récupérer le tissu adipeux, comme indiqué plus haut, mais non aseptiquement.

Les larves inoculées pour contrôler la virulence de suspensions

infectieuses sont disséquées deux mois après l'infection et les recherches d'inclusions effectuées sur frottis de tissu adipeux colorés au bleu de méthylène. Les lots témoins sont contrôlés et disséqués dans les mêmes conditions.

Les lots de larves ramassées dans la nature font l'objet de contrôles à la Station de Recherches de Lutte Biologique de la Minière. Les larves parasitées et douteuses sont éliminées à cette occasion. A l'exception d'un cas de contamination d'un lot par *Rickettsiella melolonthae*, peut-être dû à une erreur de manipulation, nous n'avons jamais observé dans nos élevages sains ou expérimentalement infectés avec le virus, de mortalité anormale due à l'un des nombreux autres germes connus chez cet insecte (HURPIN et VAGO, 1958 ; ROBERT, 1967). De même, nous n'avons jamais observé d'infection naturelle due au virus, son aire géographique de distribution étant toujours limitée à son lieu de découverte (HURPIN, communication personnelle). Enfin, en dehors des lots infectés expérimentalement nous n'avons jamais observé dans nos élevages d'infection "accidentelle" par le virus.

B - Les larves d'*Estigmene acrea*

1 - Elevage

L'élevage de plusieurs générations successives d'*Estigmene acrea* est réalisé au laboratoire dans des armoires climatisées réglées à 24°C. La surface des oeufs est stérilisée par immersion dans une solution de Clorox (5,25 % d'hyposulfite de sodium) pendant 30 minutes. Après rinçage à l'eau distillée, les oeufs sont incubés à la température ambiante. Les larves sont élevées individuellement dans des boîtes de Pétri en plastique (Falcon) et nourries sur milieu artificiel d'après la technique de ADKISSON et al. (1960). Après la mue nymphale, les nymphes sont récupérées et déposées au fond de bocaux à couvercle grillagé. Après l'émergence et l'accouplement, les femelles déposent leurs oeufs sur des bandelettes de tulle plastique collées sur les couvercles. La durée du cycle est d'environ 6 semaines.

2 - *Infections*

Nous avons réalisé deux types d'infections : infections *per os* à partir de corps d'inclusions de virus et inoculations de suspensions virales.

Les larves d'*Estigmene* âgées de deux semaines sont infectées *per os* en déposant sur de petits fragments de milieu artificiel une suspension contenant 10^4 à 10^5 corps d'inclusion. Environ 15 jours après l'infection, les symptômes de paralysie abdominale sont bien développés et les larves sont disséquées. Les suspensions de virus purifié par dissolution des corps d'inclusion sont inoculées à l'aide d'un micro-injecteur, dans une fausse patte de la larve. Chaque larve reçoit 0,02 ml de suspension.

Le contrôle des larves mortes en cours d'expérience ou fortement paralysées est réalisé en prélevant un fragment de tissu adipeux qui est observé au microscope à contraste de phase après écrasement entre lame et lamelle. La présence de corps d'inclusion de virus sert de critère d'infection.

II - TECHNIQUES DE MICROSCOPIE

Nous avons fait appel à différentes techniques de microscopie photonique et électronique.

A - Microscopie photonique

Les frottis de tissu adipeux sont colorés au bleu de méthylène de Loëffler. Les coupes histologiques à la paraffine sont colorées selon la technique de VAGO et AMARGIER (1963). Les coupes semi-fines sont colorées au bleu de toluidine. Les suspensions d'inclusions purifiées sont observées sans coloration au microscope à contraste de phase ou en fond clair. Les photographies sont prises sur un microscope Leitz Orthoplan équipé d'objectifs Planachromat et d'une caméra automatique Orthomat.

B - Microscopie électronique à balayage (*)

Les suspensions de fuseaux, de sphérules et du mélange de ceux-ci sont dispersées aux ultrasons pendant 5 minutes à 20 KC/s dans un désintégrateur à ultrasons MSE. Déposées sur porte-objet, les suspensions sont lyophilisées puis métallisées par évaporation sous vide d'or-palladium. Les préparations sont examinées au microscope électronique à balayage Stereoscan (Cambridge).

C - Microscopie électronique à transmission

1 - *Fixations et inclusions*

Des fragments de tissu adipeux provenant de larves saines et de larves infectées sont fixés et inclus de la façon suivante :

- Fixation dans le glutaraldehyde à 2 % dans un tampon cacodylate de sodium 0,1 M à pH 7,4 pendant 1 heure à 0°C.

- Après rinçage dans le tampon cacodylate froid, post-fixation dans l'acide osmique à 2 % dans le même tampon pendant 1 heure à 0°C.

- Déshydratation dans un gradient d'acétone.

- Inclusion dans 1'Epon 812 (LUFT, 1961).

Le matériel destiné à certaines digestions enzymatiques est fixé pendant 30 minutes à 1 heure dans le glutaraldehyde à 2 % puis inclus dans le glycol-methacrylate (GMA) selon la technique de LEDUC et BERNHARD (1967).

(*) Les observations au microscope à balayage ont été effectuées au Laboratoire de Protistologie et Microscopie électronique dirigé par Monsieur le Professeur E. VIVIER, à 1'Université des Sciences et Techniques de Lille.

2 - *Colorations par les techniques classiques*

- Les suspensions de virus purifiés sont déposées sur grilles recouvertes d'un film de Formvar carboné et colorées par contraste négatif au phosphotungstate de potassium à 1 %, pH 7,4, selon la technique de BRENNER et HORNE (1959). Elles sont examinées au microscope Hitachi HU 11 C à la tension de 100 KV.

- Les coupes ultrafines effectuées avec des couteaux de verre sont contrastées à l'acétate d'uranyle en solution alcoolique et au citrate de plomb selon la technique de REYNOLDS (1963). Elles sont examinées au microscope Siemens Elmiskop Ia ou au microscope Hitachi HU 11 C.

3 - *Techniques cytochimiques*

En plus des techniques classiques de colorations nous avons recherché certains constituants à l'aide de techniques cytochimiques.

- Nous avons mis en évidence l'ADN par la "coloration" préférentielle du complexe ADN-ribonucléase (effet Yotsuyanagi) sur tissus inclus en GMA (BERNHARD, 1969) ou en épon (CHARRET, 1969).

- Nous avons d'autre part caractérisé les polysaccharides par la technique à la thiocarboxyhydrazide (TCH) ou la thiosemicarbazide (TSC)-protéinate d'argent, selon la technique de SELIGMAN et coll. (1965) modifiée par THIERRY (1967).

- Nous avons également recherché les glycoprotéines par la technique de RAMBOURG (1967) sur coupes en GMA et contrasté les mucopolysaccharides par la technique au rouge de ruthénium, selon LUFT (1966).

4 - *Digestions enzymatiques*

Les digestions enzymatiques sont effectuées sur coupes ultrafines en GMA et en épon recueillies sur grilles d'or, selon la technique de

BERNHARD (1969) pour la DNase et la RNase et de MONNERON et BERNHARD (1966) pour les enzymes protéolytiques. Les coupes en épon sont préalablement "oxydées" en les faisant flotter sur une solution d'acide périodique à 10 % dans l'eau pendant 30 minutes. Les enzymes suivants ont été utilisés :

- Pepsine (Calbiochem) à différentes concentrations (0,01 % à 0,1 %) dans l'HCl 0,1 N.
- Pronase (Calbiochem) à différentes concentrations (0,01 % à 0,1 %) dans l'eau amenée à pH 7,4 avec de la soude 0,01 M.
- Désoxyribonucléase (Calbiochem) à 0,1 % dans un tampon phosphate de pH 6,8 + $MgCl_2$ 0,02 M.
- Ribonucléase (Calbiochem) à 0,1 % dans un tampon phosphate de pH 6,8.

Les extractions enzymatiques sont réalisées à 40°C pendant des temps variables. Des coupes témoins sont traitées dans des conditions identiques, en l'absence d'enzymes.

III - TECHNIQUES BIOCHIMIQUES

A - Dosages colorimétriques

1 - ADN

L'ADN est dosé par la réaction à la diphénylamine selon la méthode de DISCHE (1930) modifiée par GILES et MYERS (1965). Les courbes étalon sont réalisées ainsi : une solution mère est préparée en dissolvant 40 mg d'ADN de thymus de veau (Sigma chemical Co, Grade A) dans 100 ml de soude 0,005 M. Cette solution est conservée plusieurs mois à 4°C. Avant chaque mesure une fraction de cette solution est mélangée volume à volume à de l'acide perchlorique 1 N et chauffée pendant 15 minutes à 70°C. A partir de cette solution, les dilutions appropriées sont faites dans l'acide perchlorique 0,5 N (SHATKIN, 1969).

2 - ARN

L'ARN est dosé par la réaction à l'orcinol selon la méthode de MEJBAUM (1939). Les courbes étalon sont établies à partir d'une solution mère d'ARN de levure (Fluka) dans l'eau (0,5 mg/ml).

3 - Protéines

Les protéines sont dosées par le réactif de Folin-Ciocalteu selon la méthode de LOWRY et coll. (1951). Les courbes étalon sont établies à partir d'une solution mère dans l'eau de sérum albumine bovine cristallisée (Calbiochem, Grade A) (0,5 mg/ml).

La densité optique des solutions est lue au spectrophotomètre Coleman Junior II ou Beckman DU.

B - Analyses qualitatives et quantitatives d'acides aminés

1 - Hydrolyse acide

Les inclusions purifiées sont hydrolysées en tubes scellés sous atmosphère d'azote dans l'acide chlorhydrique 6N redistillé, à 110°C pendant 20 heures. Les hydrolysats sont évaporés lentement dans un dessicateur à vide contenant des pastilles de soude. Ils sont lavés plusieurs fois dans l'eau distillée avant d'être repris dans l'HCl 0,1 N.

2 - Hydrolyse alcaline

Les inclusions sont hydrolysées en tubes scellés sous atmosphère d'azote par de la baryte 2 N à 125°C pendant 24 heures. Après refroidissement, la baryte est précipitée par addition d'acide sulfurique 2 N. Le précipité est centrifugé, le surnageant est récupéré, le culot lavé et les surnageants mélangés sont évaporés et repris dans l'HCl 0,1 N.

3 - *Chromatographie sur couches minces*

L'analyse qualitative des acides aminés est réalisée par chromatographie bidimensionnelle sur couches minces avec un équipement Desaga. Les plaques de verre (20 x 20 cm) sont recouvertes par un film de 250 microns d'épaisseur composé d'un mélange de cellulose et de gel de silice préparé de la façon suivante : 10 gr. de cellulose MN 300 (MACHERY, NAGEL et Co.) et 4 gr. de gel de silice G selon la technique de STAHL (MERCK) homogénéisés dans 80 ml d'eau, selon la méthode de TURNER et REDGWELL (1966). Après dépôt des hydrolysats (0,5 à 1 µl) les plaques sont développées dans une première dimension dans un mélange phénol-eau 4-1, p/v, puis deux fois dans la deuxième dimension dans un mélange butanol-acide acétique-eau 5-1-4, v/v/v, (phase supérieure). Les plaques sont révélées par vaporisation d'une solution de ninhydrine à 0,2 % dans l'acétone. Les taches sont identifiées en ajoutant aux hydrolysats des témoins internes (solutions standard d'acides aminés) et à l'aide de révélateurs spécifiques : Réactif de SAKAGUCHI pour l'arginine, réactif de FEIGL, réactif à l'iodoplatinate et au nitroprussiate pour les acides aminés soufrés, réactif à l'isatine pour la proline, réactif de PAULY pour l'histidine et réactif d'EHRLICH pour le tryptophane (JUTISZ, 1960).

4 - *Chromatographie quantitative sur colonne*

L'analyse quantitative en acides aminés des hydrolysats acides d'inclusions est réalisée selon la méthode de SPACKMAN et coll. (1958) à l'aide d'un autoanalyseur Technicon. La teneur en tryptophane est estimée sur des hydrolysats alcalins par la méthode à la p-dimethylaminobenzaldehyde en employant des témoins internes (UDENFRIEND et PETERSON, 1957).

C - Analyses et dosages spectrophotométriques

Les solutions de protéines, d'acides nucléiques ou les suspensions de virions sont analysées et dosées dans le proche ultra-violet (340 nm à 220 nm) à l'aide d'un spectrophotomètre à double faisceau enregistreur Carry Model 15 ou Beckman DK 2A. On utilise des cuves en quartz de 1 cm de trajet optique.

CHAPITRE II

L'ENTOMOPOXVIRUS DU COLEOPTERE *MELOLONTHA MELOLONTHA*

Pages

I - CARACTERES GENERAUX DE LA MALADIE 17

A - Origine 17

B - Symptômes 17

C - Histopathologie 18

D - Spectre d'hôtes 19

II - LES INCLUSIONS 20

A - Structure des inclusions 20

1 - Observations au microscope photonique 20

a - Sphérules 20

b - Fuseaux 21

2 - Observations des suspensions au microscope électronique à balayage 22

a - Sphérules 22

b - Fuseaux 23

3 - Observations des coupes ultra-fines au microscope électronique 23

a - Sphérules 23

b - Fuseaux 24

B - Morphogénèse des inclusions 25

Pages

C - Discussion 26

D - Purification des inclusions 28

1 - Purification du mélange fuseaux-sphérules 28
2 - Séparation des fuseaux et des sphérules 29

E - Etude des caractères de solubilité des inclusions 29

1 - Solvants organiques 30
2 - Enzymes protéolytiques 30
3 - Influence du pH 30
4 - Action des composés réducteurs en milieu alcalin 31
5 - Sucs digestifs de l'hôte 31
a - Dissolution *in vivo* 31
b - Dissolution *in vitro* 32
c - pH des sucs digestifs 33
6 - Discussion 33

F - Composition chimique des inclusions 35

1 - Teneur en ARN et ADN 35
2 - Composition en acides aminés 36
3 - Etude dans l'ultra-violet des protéines de fuseaux et de sphérules 38
a - Préparation des protéines 38
b - Spectre dans l'ultra-violet 39
4 - Discussion 40

G - Essais de pouvoir infectant des suspensions purifiées de fuseaux, de sphérules. Essais de toxicité de leurs protéines 45

1 - Inclusions figurées 45
2 - Protéines d'inclusions 46
3 - Discussion 46

H - Conclusions 48

Pages

III - LE VIRION 50

A - Structure du virion 50

1 - Observation en contraste négatif 50

2 - Observation en coupes ultra-fines 51

a - Structure des virions inclus dans les sphérules 51

b - Structure des virions libres 53

c - Coupes sériées 53

3 - Etude cytochimique du virion 54

a - Colorations spécifiques 54

b - Digestions enzymatiques 55

4 - Discussion 55

B - Purification des virions 56

1 - Purification des virions libres 56

2 - Purification des virions contenus dans les sphérules 58

3 - Critique des techniques de purification 59

C - Caractérisation des suspensions virales 61

1 - Spectre d'absorption dans l'ultra-violet 61

2 - Dosage de l'acide nucléïque et des protéines du virion 61

3 - Essais de virulence des virions purifiés à partir des sphérules 63

4 - Discussion 65

Pages

IV - ETUDE ULTRASTRUCTURALE DU CYCLE DE MULTIPLICATION VIRALE DANS LES CELLULES DU TISSU ADIPEUX 66

A - Essais de multiplication du virus sur cultures de cellules *in vitro* 66

B - Conditions d'étude du cycle dans les cellules du tissu adipeux *in vivo* 68

C - Morphogénèse virale 69

D - Structures associées aux aires de virogénèse 70

E - Dissémination des virions 70

1 - Expulsion des virions libres 71

2 - Inclusion des virions dans les sphérules 71

F - Discussion 73

V - LES ALTERATIONS DES CELLULES DU TISSU ADIPEUX AU COURS DE L'INFECTION VIRALE 74

A - Ultrastructure des cellules saines 75

B - Ultrastructure des cellules infectées 76

C - Discussion 77

CHAPITRE II

L'ENTOMOPOXVIRUS DU COLEOPTERE *MELOLONTHA MELOLONTHA*

I - CARACTERES GENERAUX DE LA MALADIE

A - Origine

Le virus dont l'étude fait l'objet de ce chapitre est l'agent d'une maladie du hanneton commun, le coléoptère *Melolontha melolontha* L., décrite en 1963 par HURPIN et VAGO sous le nom de "maladie à inclusions cytoplasmiques fusiformes". Cette maladie a été découverte dans une population naturelle de l'insecte au cours de sondages effectués par la Station de Lutte Biologique et de de Biocoenotique de La Minière (I.N.R.A.) dans les prairies des environs de Ségrie, localité de la Sarthe. La nature virale de l'agent et sa ressemblance avec les poxvirus ont été reconnues par VAGO (1963).

B - Symptômes

Les larves fortement atteintes se caractérisent par une perte de turgescence, elles sont molles au toucher et pratiquement immobiles. Elles présentent une opacification de la région pygidiale (dernier segment de l'abdomen) due à l'accumulation de fragments de tissu adipeux véhiculés par l'hémolymphe, masquant ainsi l'ampoule rectale normalement visible à travers la cuticule. (Pl. II, Fig. 2 et 3). A la dissection le tube digestif est pratiquement vide, la plupart des lobes du tissu adipeux sont dissociés et forment une bouillie blanchâtre flottant dans la cavité viscérale.

Le délai d'apparition de ces symptômes est variable selon le stade larvaire considéré, la température d'élevage, le mode d'infection et la quantité de matériel infectieux administrée (HURPIN, 1968 ; ROBERT, 1967, 1969). Bien que l'on ne dispose à ce jour d'aucune donnée quantitative précise sur l'influence de ce dernier paramètre (estimation du nombre de particules infectieuses dans une préparation), on sait que, d'une façon générale, l'évolution de la maladie est lente. Ainsi, les symptômes précédemment décrits ne sont évidents qu'au bout de 4 à 6 mois chez des larves élevées à 20°C et inoculées au début du stade L_3 avec des suspensions permettant d'obtenir 100 % de mortalité.

C - Histopathologie

Bien plus que les signes externes, l'examen histologique permet un diagnostic rapide et sûr de la maladie, particulièrement à des stades précoces où les symptômes sont parfois discrets. En effet, l'examen au microscope photonique, en fond clair ou en contraste de phase, d'un fragment de tissu adipeux écrasé entre lame et lamelle révèle la présence d'un grand nombre d'inclusions allongées en forme de fuseaux et d'inclusions parasphériques moins nombreuses et de grande taille. Ces deux types d'inclusions qui sont la caractéristique essentielle de la maladie seront désignées dans la suite de notre exposé par les noms respectifs de fuseaux et de sphérules.

AMARGIER et Coll. (1964) ont étudié sur coupes histologiques l'évolution des lésions tissulaires chez les larves au cours de l'infection. D'après ces auteurs, le tissu adipeux est le principal siège des modifications pathologiques. Les premiers fuseaux dont la taille ne dépasse pas un micron apparaissent dans la région périnucléaire du cytoplasme 20 à 30 jours après l'infection. D'abord localisée à quelques îlots de cellules dans un lobe de tissu adipeux, l'infection gagne de proche en proche les cellules voisines. C'est ainsi que l'on peut observer à côté des lobes déjà fortement atteints, d'autres ne présentant aucune altération. Dans les mois qui suivent, la taille et le nombre des fuseaux augmentent régulièrement et, en fin d'évolution, la plupart des lobes du tissu adipeux sont remplis d'inclusions. Parallèlement au développement des fuseaux, mais plus tardivement, apparaissent également dans le cytoplasme les sphérules. D'abord de petite taille,

elles deviennent très volumineuses, atteignant 15 à 20 microns de diamètre moyen. Leur nombre est toujours plus réduit que celui des fuseaux et ne dépasse pas une ou deux inclusions par cellule. Outre leur différence de forme, les sphérules se distinguent des fuseaux par une affinité tinctoriale moins intense quoique semblable. Elles se colorent par exemple en rose pâle avec la coloration de VAGO et AMARGIER (1963) alors que les fuseaux sont colorés en rouge vif par cette même technique (Pl. II, Fig. 4 et 5). Les sphérules présentent en outre de façon constante des fissures rayonnantes partant du centre de l'inclusion (Pl. III, Fig. 8).

D'autres travaux ont montré que l'infection n'était pas localisée uniquement aux cellules adipeuses. Ainsi, BONAMI (1970) a signalé la présence de fuseaux sur frottis et coupes histologiques d'hémocytes. Dans une étude détaillée au microscope électronique, DEVAUCHELLE et Coll. (1971) ont mis en évidence la multiplication du virus dans tous les types de cellules sanguines, avec présence de fuseaux et plus rarement de sphérules. Etudiant l'évolution de la maladie aux stades nymphal et adulte, BONAMI (1970) a noté la présence de fuseaux dans les muscles en histolyse, les cellules péritrachéales, les gaines conjonctives des gonades et les cellules periganglionnaires de la chaîne nerveuse. Ces observations pourraient permettre de penser que ces tissus sont également sensibles à l'infection virale.

D - Spectre d'hôtes

HURPIN et ROBERT (1967), ROBERT (1967) ont étudié la sensibilité des larves de différents insectes à l'entomopoxvirus de *Melolontha*. Ces auteurs ont montré que seules quelques espèces systématiquement et biologiquement proches de l'hôte naturel pouvaient être infectées expérimentalement. Sur 22 espèces de coléoptères testés, 8 espèces étaient sensibles au virus après inoculation de suspensions infectieuses dans la cavité générale et 5 seulement par contamination du milieu d'élevage (infection *per os*). Il s'agissait dans tous les cas d'espèces appartenant à 3 sous-familles de la famille des *Scarabaeidae* à laquelle appartient le hanneton commun. Le virus n'est pas pathogène pour différentes larves de lépidoptères et de diptères utilisées au cours de ces essais. Nous avons d'autre part établi que l'ingestion par des Orthoptères et des Dictyoptères de larves infectées ou de

nourriture contaminée par des suspensions d'inclusions n'entraînait aucune morbidité pour ces insectes (BERGOIN, 1966). Enfin nous mentionnerons l'innocuité pour les vertébrés de suspensions virulentes inoculées intrapéritonéalement à des souris, cobayes et lapins ou dans le sac vitellin d'embryons de poulets (ROBERT, 1967 ; CROIZIER et VEYRUNES, 1971).

II - LES INCLUSIONS

A - Structure des inclusions

Nous avons étudié la structure des fuseaux et des sphérules par différentes techniques de microscopie : microscopie photonique et électronique à balayage sur des inclusions purifiées entières, microscopie électronique sur coupes ultrafines de ces inclusions dans le tissu adipeux des larves de *Melolontha*. Nous nous sommes efforcés d'établir les corrélations existant entre les données de ces différentes techniques par une description aussi précise que possible de ces inclusions. De même l'étude cytochimique à haute résolution de ces inclusions a permis de comparer les résultats obtenus par cette technique à ceux de l'analyse biochimique.

1 - Observations au microscope photonique

a - Sphérules

Grâce à leur forte réfringence naturelle les sphérules en suspension dans l'eau peuvent être examinées directement au microscope photonique en fond clair. Ainsi observées elles apparaissent comme des corps réfringents parasphériques ou légèrement ovoïdes dont le diamètre se situe entre 12 et 18 microns (Pl. III, Fig. 6). Leur texture n'est pas homogène et l'on remarque au centre des inclusions des granulations rayonnantes formant des alignements radiaires (Pl. III, Fig. 8).

Sur coupes semi-fines de tissu adipeux inclus en épon, apparaissent à l'intérieur des sphérules de petites granulations localisées à la zone centrale de l'inclusion (Pl. III, Fig. 7). Ainsi que nous le verrons

plus loin, ces grains représentent les virions inclus que leur grande taille et la faible épaisseur des coupes permettent de voir au microscope photonique. Des images semblables sont obtenues en traitant les sphérules par une solution de soude 0,1 M. En milieu alcalin les sphérules gonflent, perdent leur réfringence et prennent la forme de "citrons" (Pl. III, Fig. 9). L'éclaircissement de la matrice dessphérules rend alors possible l'observation des virions qu'elles contiennent sous forme de petites granulations réfringentes.

b - Fuseaux

Observés dans les mêmes conditions que ci-dessus, les fuseaux se présentent comme des corps à contours réguliers arrondis au centre et pointus aux deux extrémités (Pl. IV, Fig. 10). Leurs dimensions sont très variables, les plus gros dépassant ~ 15 µm dans leur grand axe, les plus petits n'atteignant pas un micron. Quelle que soit leur taille, le rapport entre leur longueur et leur largeur est à peu près constant, se situant entre 1,8 et 2.

A côté de ces fuseaux typiques, on note également la présence en petit nombre d'inclusions à contours géométriques complexes. Les formes les plus fréquemment observées sont des étoiles, des X, des fuseaux avec une branche latérale ou des inclusions donnant l'image de deux fuseaux accolés selon leur grand axe (Pl. IV, Fig. 11 à 13). Exceptionnellement on rencontre des inclusions à plusieurs branches orientées dans différents plans (Pl. IV, Fig. 14). Ces formes semblent toutes apparentées à celles des fuseaux typiques car, à leur image, elles possèdent des extrémités pointues. Elles paraissent résulter de la coalescence de deux ou plusieurs éléments pour former des arrangements comparables à ceux des cristaux dans une "macle". Cette dernière hypothèse est étayée par nos observations sur le comportement particulier de ces inclusions en milieu alcalin réducteur (voir section II E de ce chapitre).

Mis en contact avec une solution de thioglycolate 0,1 M + bicarbonate 0,1 M de pH 10,2, les fuseaux se craquèlent généralement selon leur grand axe mais les fragments qui en résultent n'ont pas de forme particulière. Par fragmentation en morceaux de plus en plus petits, ils finissent par se dissoudre. Dans les premiers stades de dissolution des inclusions complexes

par contre, on note l'apparition de fentes dans les plans précis, toujours les mêmes pour un type d'inclusion donné, aboutissant à la séparation de "sous-unités" semblables entre elles (Pl. IV, Fig. 15 et 16). Nous verrons plus loin que ce mode de dissolution est vraisemblablement lié à la structure cristalline de ces inclusions.

2 - *Observations des suspensions au microscope électronique à balayage*

La microscopie électronique à balayage apporte une contribution importante à l'étude des surfaces et de la forme des fuseaux et des sphérules, grâce à sa grande profondeur de champ. C'est ainsi que nous avons pu observer ces inclusions sous des incidences diverses, et préciser ainsi leur configuration tridimensionnelle.

a - Sphérules

Deux types principaux de sphérules s'observent au microscope à balayage : des sphérules à surface rugueuse mais ne présentant pas de trous et des sphérules dont la surface est percée de petits "cratères" (Pl. V, Fig. 17 et 18 ; Pl. VI, Fig. 21). Ces deux types de sphérules correspondent à deux stades de maturation de ces inclusions. La croissance des sphérules se produit en effet par accumulation de matériel protéinique incorporant progressivement les virions qui se trouvent à sa périphérie (voir section IV D de ce chapitre). A partir d'un certain stade de développement de l'inclusion, il n'y a plus incorporation de virions mais la synthèse de protéine se poursuivant, il se forme un "cortex" à la périphérie (voir section suivante). Lorsqu'on prélève le tissu adipeux des larves pour en extraire les inclusions, toutes n'ont pas atteint le même stade de maturation et l'on extrait entre autres des sphérules incomplètement développées. Les virions partiellement inclus qui se trouvaient à leur surface sont détruits par les procédés de purification laissant leurs empreintes qui apparaissent sous forme de petits cratères. Les sphérules à surface rugueuse correspondent au contraire à des inclusions ayant achevé leur maturation. Chez certaines sphérules, on note la présence d'un gros cratère central qui semble correspondre à un effondrement de l'inclusion (Pl. V, Fig. 19 et 20).

b - Fuseaux

La configuration tridimensionnelle des fuseaux apparaît très nettement à l'observation au microscope à balayage. La surface des fuseaux ne possède pas d'ornementation particulière, contrairement à celle des sphérules. Elle est uniformément lisse à l'exception de quelques grains épars qui sont probablement des impuretés non éliminées par les traitements de purification ni par les ultrasons (Pl. VI, Fig. 22). On remarque la présence d'arêtes longitudinales qui s'estompent dans la partie renflée des fuseaux. Sur la figure 21 (Pl. VI) on reconnaît un fuseau en vue apicale avec 4 arêtes partant du sommet. Les fuseaux seraient donc des cristaux des sommets desquels partiraient 4 arêtes s'incurvant et s'estompant dans sa partie renflée.

La technique de balayage à d'autre part permis de préciser la structure des inclusions complexes. L'aspect de "macles" de l'inclusion en étoile et du fuseau à une branche latérale présentés sur les figures 23 et 24 (Pl. VI) est évident. Les zones de contact des différents éléments constituant ces "macles" sont soulignées par de légères dépressions. Il est toutefois difficile de définir avec précision sur ces clichés le nombre d'éléments qui constituent des inclusions car on ne peut observer leurs zones de contact que sur une seule face.

3 - *Observations des coupes ultrafines au microscope électronique*

a - Sphérules

L'organisation d'une sphérule complètement développée apparaît clairement sur une coupe ultrafine observée à faible grossissement (Pl. VII, Fig. 25). On reconnaît à l'intérieur d'une substance homogène à contours nets des taches ovales ou circulaires très denses aux électrons qui sont des sections, longitudinales ou transversales de virions inclus. Ces derniers ne sont pas disposés au hasard dans la masse de l'inclusion mais sont régulièrement espacés les uns des autres. Ils semblent disposés en travées rayonnantes ainsi que le suggèrent les nombreux profils ovales observés dans la partie externe de la sphérule alors que les virions situés dans la zone centrale présentent des profils ronds. Cette disposition s'explique par le mode d'incorporation des virions qui sont toujours fixés par une extrémité, leur grand

axe orienté radialement dans les sphérules en cours de développement (voir section IV D de ce chapitre et Pl. XXXII, Fig. 104).

La couche externe des sphérules ayant achevé leur développement ne contient pas de virions, la protéine formant un "cortex" entre ces derniers et le cytoplasme. Cette couche correspond à celle observée au microscope photonique sur coupes semi-fines ou après gonflement des sphérules dans la soude 0,1 M (Pl. III, Fig. 7 et 9).

A fort grandissement, la substance fondamentale des sphérules se résoud en une fine trame cristalline difficile à observer. La distance de centre à centre entre deux lignes sombres est d'environ 55 ± 5 Å. La trame est interrompue de place en place par l'insertion des virions mais sa direction n'est pas perturbée (Pl. VII, Fig. 26). Dans les plans de coupes favorables, on peut suivre l'orientation des molécules jusqu'à la périphérie des inclusions. Les sphérules sont en contact direct avec le cytoplasme environnant ce qui les différencie nettement des fuseaux comme nous le verrons ci-dessous.

b - Fuseaux

Sur une coupe ultrafine dans une cellule du tissu adipeux les fuseaux apparaissent comme des amas de substance homogène de forte densité aux électrons (Pl. VIII, Fig. 27). Ils sont toujours entourés d'une membrane tripartite de réticulum endoplasmique granulaire (citerne ergastoplasmique) de 75 Å d'épaisseur (Pl. IX, Fig. 28). Leur taille varie dans de grandes proportions, les plus petits étant souvent groupés à l'intérieur d'une même menbrane de réticulum (Pl. VIII, Fig. 27). A fort grandissement, la substance des fuseaux se résoud en une trame cristalline homogène à une ou deux directions selon les plans de coupe (Pl. IX, Fig. 29). La distance centre à centre, mesurée sur des coupes où les intersections des deux directions de la trame sont à angles droits est de 60 ± 5 Å. Cette distance est la même dans les trois directions. Contrairement aux sphérules dont la trame cristalline est interrompue de place en place par des virions inclus, aucune discontinuité ne se remarque ici et dans les plans de coupes favorables, on peut suivre l'orientation des molécules d'un bout à l'autre de l'inclusion. Les caractéristiques ultrastructurales des fuseaux observées dans différents

types d'hémocytes sont identiques (DEVAUCHELLE et al., 1971).

Occasionnellement, on rencontre dans les coupes des sections d'inclusions complexes. Leur examen confirme qu'il s'agit bien d'inclusions de type fuseaux en ce sens qu'elles ne contiennent pas de virions inclus et sont également entourées d'une membrane de récitulum endoplasmique (Pl. X, Fig. 30). La trame cristalline des éléments de ces inclusions peut être observée lorsque le plan de coupe est favorable. L'orientation des molécules est différente pour chacun des éléments et l'on constate un changement de direction de la trame dans les plans de contact de deux éléments adjacents (Pl. X, Fig. 31). Ces plans correspondent vraisemblablement à des zones de moindre résistance de la "macle" ainsi que le suggère la dissolution de ces inclusions en milieu alcalin réducteur (voir plus haut).

L'incubation de coupes ultra-fines en GMA dans une solution de pepsine à 0,1 % pendant 30 minutes à 40°C conduit à la digestion presque totale des fuseaux (Pl. XI, Fig. 32). La pronase utilisée dans les mêmes conditions de concentration pendant 10 minutes extrait une partie de la substance du fuseau (Pl. XI, Fig. 33). Après 30 minutes l'extraction est pratiquement complète (Pl. XI, Fig. 34).

Les résultats des digestions enzymatiques sur coupes ultra-fines de sphérules seront exposés lors de l'étude cytochimique des virions inclus (section III A de ce chapitre). Nous mentionnerons dès à présent que la trame cristalline des sphérules n'est apparemment pas attaquée par les enzymes protéolytiques dans les conditions où nous avons opéré (voir Pl. XXII, Fig. 70 et 71).

B - Morphogénèse des inclusions

Les sphérules apparaissent dans des aires cytoplasmiques généralement éloignées du noyau et se développent au contact même du cytoplasme qui les entoure. Leur morphogénèse étroitement liée à la dernière phase du cycle de réplication virale sera précisée lors de l'exposé de ce cycle (section IV E de ce chapitre).

Les premiers fuseaux apparaissent autour du noyau environ un mois après l'inoculation du virus, ainsi que l'ont noté AMARGIER et Coll. (1964) sur coupes histologiques. Les plus petits fuseaux décelables au microscope électronique s'observent effectivement dans les aires cytoplasmiques proches de la paroi nucléaire (Pl. XII, Fig. 38). Ils sont groupés en amas ou isolés mais toujours enfermés dans une citerne ergastoplasmique. Tout autour du noyau, on trouve également de nombreuses citernes contenant du matériel dense comparable à celui des fuseaux mais non cristallisé (Pl. XII, Fig. 38). Le contenu de ces vésicules pourrait provenir de matériel situé dans l'espace périnucléaire comme le suggère la présence d'amas de substance dense accumulée entre les membranes interne et externe de certains noyaux de cellules fortement infectées (Pl. XII, Fig. 37) et l'observation d'un fuseau entre ces membranes (Pl. XII, Fig. 36). Exceptionnellement nous avons observé un fuseau à l'intérieur du noyau (Pl. XII, Fig. 35).

La croissance des fuseaux s'effectue à l'intérieur des vésicules ergastoplasmiques par condensation et cristallisation de matériel à la périphérie de l'inclusion. Dans les cellules fortement infectées, les gros fuseaux sont nombreux et dispersés dans le cytoplasme. Toutefois, on note toujours dans ces cellules la présence de petits fuseaux à proximité du noyau, indiquant une synthèse continue de ces inclusions pendant toute la durée de la maladie.

C - Discussion

L'étude de la morphologie et de l'ultrastructure des fuseaux et des sphérules associés à l'entomopoxvirus de *Melolontha* indique les différences importantes entre ces deux types d'inclusions.

Les sphérules qui contiennent des virions inclus sont assimilables aux corps d'inclusion de virus d'autres maladies d'insectes dont on connaît trois types principaux :

- Les polyédroses nucléaires dont les agents sont des virus en bâtonnets de 40-70 nm de large et de 250 à 400 nm de long contenant de l'ADN, se multipliant dans le noyau et formant des inclusions polyédriques

cristallines renfermant de nombreux virions (polyèdres nucléaires).

- Les granuloses dont les agents ressemblent à ceux du groupe précédent mais se multiplient dans le cytoplasme et forment de petits corps d'inclusion à structure cristalline ne contenant en général qu'une seule particule virale (granules).

Les virus de polyédroses nucléaires et de granuloses sont actuellement classés dans le même genre, celui des Baculovirus (WILDY, 1971).

- Les polyédroses cytoplasmiques dont les agents sont des virus parasphériques de 60 nm de diamètre moyen, à ARN, se multipliant dans le cytoplasme et formant des inclusions polyédriques cristallines contenant de nombreux virions (polyèdres cytoplasmiques).

Toutefois, ainsi que l'ont noté les premiers auteurs (VAGO, 1963 ; VAGO et CROISSANT, 1964 ; AMARGIER et al., 1964) les sphérules diffèrent des corps d'inclusions de virus mentionnés ci-dessus par leur forme, leur taille et la nature des virions qu'elles renferment. Comme nous le préciserons dans la suite de notre exposé, les sphérules ont leur équivalent chez tous les entomopoxvirus et correspondent en fait aux inclusions de type A de certains poxvirus de vertébrés (voir chapitres III et IV).

Les fuseaux diffèrent essentiellement des sphérules, en plus de leur forme, par l'absence de virions inclus dans leur trame cristalline et la présence régulière d'une membrane de réticulum endoplasmique les entourant. Leur mode de développement est également fondamentalement différent de celui des sphérules. De plus, l'apparition des fuseaux précède toujours celle des sphérules (AMARGIER et al., 1964).

Les inclusions complexes diffèrent peu des fuseaux en dehors de leur forme. Comme eux, elles possèdent une structure cristalline et se développent à l'intérieur des vésicules ergastoplasmiques. Les formes qui présentent ces inclusions résultent de l'assemblage d'éléments en édifices cristallins comparables aux "macles" de certains minéraux. Les éléments d'un même "macle" seraient semblables entre eux et accolés suivant des plans caractéristiques responsables de sa configuration tridimensionnelle. Il s'agit

peut-être d'"accidents" de cristallisation qui se produiraient alors à un stade très précoce de développement du cristal. En effet, la présence dans les suspensions de fuseaux d'inclusions complexes de différentes tailles et leur mode de développement permettent d'affirmer qu'elles ne résultent pas de la coalescence tardive de "sous-unités" dont la présence aurait été remarquée.

Au moment de leur découverte (HURPIN et VAGO, 1963), les fuseaux n'avaient leur équivalent dans aucune autre maladie d'insectes. Depuis, ils ont été retrouvés associés à d'autres entomopoxvirus (voir chapitre IV). D'autre part, des formations analogues ont été observées dans le cytoplasme de cellules d'insectes infectées avec des virus de polyédroses nucléaires (ADAMS et WILCOX, 1968 ; CUNNINGHAM, 1971 ; HUGER et KRIEG, 1968 ; MORRIS, 1962, 1971 ; SMIRNOFF, 1970).

D - Purification des inclusions

1 - Purification du mélange fuseaux-sphérules

Les fuseaux et les sphérules sont purifiés à partir du tissu adipeux prélevé sur larves malades (voir chapitre Matériel et Techniques pour la technique de prélèvement). Sitôt prélevé, le tissu adipeux est recueilli dans un flacon maintenu dans de la glace contenant de l'eau distillée ou une solution à 2 % d'acide ascorbique tamponnée à pH 7,5 par du Tris 0,1 M. Le froid et l'acide ascorbique permettent d'éviter la mélanisation des tissus qui se produit rapidement à température ambiante, ce qui gêne les étapes ultérieures de la purification. Les tissus prélevés sont conservés au congélateur à -30°C ou broyés extemporairement à l'aide d'un broyeur Potter. Les broyats sont centrifugés pendant 5 à 10 minutes à 1800 g, les surnageants éliminés et les culots délipidés dans un mélange alcool-éther 3/1, v/v. Après sédimentation, ils sont redispersés dans environ 40 fois leur volume d'eau distillée. Pour obtenir une bonne dispersion, les culots sont traités aux ultrasons, 3 fois 20 secondes à 20 KC/s dans un désintégrateur à ultrasons MSE. Les inclusions sont lavées ainsi 6 à 8 fois jusqu'à élimination presque totale des petits débris cellulaires. Les gros débris de tissus sont éliminés si nécessaire par une courte centrifugation (1 à 2 minutes) à 500 g. La

pureté des suspensions est contrôlée au microscope photonique. Ces suspensions sont utilisées telles quelles pour l'extraction des virus par dissolution des sphérules.

2 - *Séparation des fuseaux et des sphérules*

La séparation des sphérules et des fuseaux est obtenue en dispersant le mélange d'inclusions dans une solution d'iodure de potassium de densité 1,36 en présence d'une trace (0,01 %) de thiosulfate de sodium et en centrifugeant à 15.000 g pendant 15 minutes. Les sphérules moins denses que les fuseaux se concentrent dans la couche supérieure du tube tandis que les fuseaux sont récupérés dans le culot. Les sphérules sont redispersées dans la même solution d'iodure de potassium et centrifugées comme précédemment afin d'éliminer les quelques fuseaux restants. Les fuseaux sont redispersés dans une solution d'iodure de potassium de densité 1,40 et centrifugés dans les mêmes conditions. Ils se concentrent alors dans la partie supérieure du tube. Les deux types d'inclusions sont ainsi récupérés à la partie supérieure des tubes, lavés plusieurs fois dans l'eau distillée et lyophilisés. Ils sont conservés sous vide en présence de P_2O_5. Le contrôle de la pureté des préparations est effectué au microscope photonique (voir Pl. III et IV, Fig. 6 à 16). Les préparations de fuseaux sont généralement exemptes de sphérules mais on trouve toujours dans les suspensions de sphérules quelques petits fuseaux en quantité pondéralement négligeable.

E - Etude des caractères de solubilité des inclusions

Le problème de la détermination des conditions de solubilisation des inclusions est apparu lorsqu'on a voulu extraire les virions contenus dans les sphérules. Il importait en effet de définir les conditions optimales de milieu permettant la solubilisation de la protéine cristallisée des sphérules sans dégradation des virions.

Nous avons défini ces conditions en partant d'un mélange purifié d'inclusions ce qui nous a permis d'étudier simultanément les caractères de solubilité des fuseaux et des sphérules. La concentration finale des

inclusions était de 0,33 mg/ml. Pour chaque essai, les suspensions étaient contrôlées au microscope photonique et les inclusions comptées à la cellule de Thoma . Le choix des solvants nous a été suggéré en partie par ce que l'on sait des propriétés chimiques des inclusions de virus des polyédries d'insectes (BERGOLD, 1963).

1 - *Solvants organiques*

A la température ordinaire, les inclusions sont insolubles dans l'éthanol, le méthanol, l'éther éthylique, le chloroforme, les mélanges méthanol-chloroforme (1-2,v/v) ou alcool-éther (3-1, v/v).

2 - *Enzymes protéolytiques*

Incubées à 38°C pendant 3 jours dans une solution de trypsine à 0,25 % tamponnée à pH 7, les inclusions ne subissent aucun changement notable. De même elles sont peu sensibles à l'action de la pepsine à 0,25 % dans un tampon HCl-KCl de pH 2,2 (2 jours à 38°C). L'action successive de ces deux enzymes ne semble pas plus efficace. La pronase à 0,25 % en solution dans un tampon phosphate de pH 7 semble plus active surtout sur les sphérules. Après 2 jours d'incubation à 38°C on observe plusieurs sphérules montrant des craquelures mais l'attaque ne semble pas profonde.

3 - *Influence du pH*

A la température ordinaire les inclusions sont particulièrement résistantes à l'action des acides : l'acide chlorhydrique 0,25 M est sans effet sur elles. Elles ne subissent aucune altération lorsqu'elles sont mises en suspension dans des tampons phosphate I M de pH 5 à 9. Par contre, elles se dissolvent en quelques heures dans la soude I M et gonflent dans la soude 0,1 M. Les solutions alcalines utilisées pour dissoudre les corps d'inclusion de virus de polyédries nucléaires ou cytoplasmiques et de granuloses ne suffisent pas à solubiliser complètement les inclusions de *Melolontha* : après 3 heures dans le carbonate de soude à 2 % les fuseaux sont dissous mais les sphérules, bien qu'ayant subi un gonflement important, n'ont pas éclaté.

4 - Action des composés réducteurs en milieu alcalin

L'adjonction à des tampons de pH 10-11 de composés réducteurs tels que le 2-mercaptoéthanol, la cystéine ou le thioglycolate de soude, permet de dissoudre rapidement les inclusions. C'est ainsi que des sphérules et des fuseaux en suspension dans un tampon glycine-soude à pH 12 ont subi au bout de deux heures à la température du laboratoire un glonflement avec perte de réfringence et dissolution partielle ; à pH 11, on note une diminution de réfringence avec gonflement moins accusé ; mais à pH 10,25 le tampon est presque sans action. Les inclusions à la même concentration, dans une solution de chlorhydrate de cystéine amenée à pH 12 avec de la soude sont dissoutes instantanément ; à pH 11, la dissolution a lieu en quelques minutes et à pH 10,25 les sphérules et une partie des fuseaux disparaissent en 1 à 2 heures. L'action de la cystéine ne se manifeste plus à pH 9 ou en concentration avoisinant 0,01 M. Le thioglycolate agit dans les mêmes limites de pH et de concentration : par exemple les sphérules sont dissoutes en 15 minutes dans une solution de thioglycolate de sodium 0,1 M et de bicarbonate 0,1 M amenée à pH 10,25 avec de la soude, alors qu'un tampon carbonate-bicarbonate de même pH n'altère que très légèrement leur aspect morphologique après plusieures heures d'action.

5 - Sucs digestifs de l'hôte

a - Dissolution *in vivo*

Dans une première série d'expériences, nous avons étudié l'action des sucs digestifs des larves de hanneton sur un mélange d'inclusions ingéré. Les larves sont disséquées 3, 6, 12, 24 et 48 heures après ingestion forcée du mélange d'inclusions et le contenu intestinal prélevé en trois points : partie antérieure et postérieure de l'intestin moyen et ampoule rectale. Les prélèvements sont effectués en ponctionnant le tube digestif à l'aide d'une pipette Pasteur finement étirée ou en le sectionnant. Trois larves sont examinées à chaque prélèvement. Le bol alimentaire déposé sur une lame porte-objet est examiné directement au microscope en contraste de phase ou en fond clair après coloration au bleu de méthylène.

Ces examens ont révélé que les sphérules sont attaquées par

les sucs digestifs et que leur dégradation a lieu dès la partie antérieure de l'intestin moyen. A l'exception d'une larve dans laquelle nous avons retrouvé des sphérules fortement attaquées 3 heures seulement après l'ingestion forcée, les premières sphérules dégradées ne se reconnaissent de façon régulière qu'au bout de 24 heures. Les fuseaux semblent également attaqués au niveau de l'intestin moyen. Il est toutefois difficile de distinguer les fragments de fuseaux des nombreux débris de toute sorte contenus dans le bol alimentaire.

La proportion d'inclusions dégradées est apparemment faible et variable d'un essai à l'autre. Ainsi, dans certains prélèvements effectués après 48 heures d'ingestion, nous n'avons plus retrouvé de sphérules dans l'ampoule rectale alors que dans d'autres cas les fuseaux et les sphérules intacts étaient abondants. Signalons qu'un jeûne de 2 à 3 jours précédant l'ingestion des inclusions ne modifie apparemment pas les conditions de leur dissolution *in vivo*.

b - Dissolution *in vitro*

Afin de préciser ces premiers résultats, nous avons étudié dans une deuxième série d'expérience l'action *in vitro* des sucs digestifs sur les inclusions. Pour cela, l'intestin moyen d'une part, l'ampoule rectale d'autre part sont prélevés sur 15 larves, centrifugés à 4.000 g pendant 15 minutes, les sucs digestifs récupérés dans les surnageants. A un volume d'un mélange sphérules-fuseaux (1,3 mg de chacun des 2 types d'inclusions/ml), on ajoute 10 volumes de l'un ou l'autre des deux surnageants et une goutte du mélange est déposée sur une lame creuse calibrée de 0,01 mm de profondeur. On recouvre d'une lamelle que l'on lutte à la paraffine pour éviter la dessiccation. Les lames sont observées toutes les 12 heures.

Au cours des premières 24 heures on n'observe aucune attaque appréciable des inclusions incubées dans le suc digestif de l'une ou l'autre portion du tube digestif. Les premières sphérules montrent de profondes fissures radiales et un éclaircissement de leur région centrale. La proportion de fuseaux attaqués est beaucoup plus faible, cependant on reconnaît nettement la fragmentation de certains d'entre eux. La proportion et le degré d'attaque des sphérules incubées dans le suc digestif de l'ampoule rectale

sont plus faibles après 48 heures. On reconnaît également dans ce cas des débris de fuseaux. Après 3 jours d'incubation, la totalité des sphérules est attaquée dans le suc digestif de l'intestin moyen et les fuseaux détruits sont plus nombreux. On note une évolution semblable mais moins prononcée, dans le suc digestif de l'ampoule rectale.

c - pH des sucs digestifs

Le pH des sucs digestifs mesuré dans les surnageants de centrifugation est de 8,35 pour l'intestin moyen et 8,0 pour l'ampoule rectale (moyenne de deux mesures). Ces mesures ont été effectuées à l'aide d'une électrode combinée, modèle GK 2320 C de Radiometer, couplée à un pHmètre Radiometer, type PHM 26. Nous avons vérifié ces données par une série de mesures de pH des sucs digestifs prélevés à l'aide de pipettes Pasteur finement étirées. La chaîne utilisée pour ces micromesures comprenait une électrode de verre (réf. EA 136 de Methrom) recourbée et terminée par une cupule dans laquelle on dépose une goutte d'échantillon et une électrode de référence (réf. EA 404 de Methrom). La mesure est réalisée en amenant en contact l'électrode de référence avec la goutte d'échantillon. Les lectures sont effectuées sur un pHmètre Methrom modèle E 300 B. Les mesures effectuées extemporanément à l'aide de micro-électrodes ont donné les valeurs suivantes : 8,1 pour le suc digestif de l'intestin moyen et 7,8 pour celui de l'ampoule rectale (moyenne de 6 mesures).

6 - *Discussion*

L'étude des caractères de solubilité des fuseaux et des sphérules a montré leur résistance inusitée aux divers agents chimiques, en particulier aux solutions alcalines. Contrairement aux autres types d'inclusions de virus d'insectes (polyèdres et granules) qui sont pour la plupart franchement solubles dans les solutions de carbonate de sodium avoisinant pH 10 (SMITH, 1968), les sphérules ne sont dissoutes en milieu alcalin qu'à des pH $\geqslant$ 12 incompatibles avec le maintien de l'intégrité des virions qu'elles renferment. Leur dissolution ne peut être réalisée à des pH avoisinant 10 qu'en présence d'agents réducteurs. Comme il sera précisé dans la section suivante, les différences de comportement en milieu alcalin entre ces inclusions proviennent de la différence dans la teneur en résidus cystine de leurs protéines.

La résistance des inclusions à l'action *in vitro* des enzymes protéolytiques est en contradiction apparente avec leur nature essentiellement protéinique (voir section suivante). Elle peut être due à une incompatibilité entre la configuration spatiale des chaînes polypeptidiques dans l'état cristallisé et l'accrochage des sites actifs des enzymes étudiés ou à des propriétés électrostatiques de surface des inclusions. L'étude de l'action de ces enzymes sur les protéines solubilisées de fuseaux et de sphérules apporterait des éclaircissements sur ce problème. De même les différences observées dans le cas des fuseaux qui, à l'état de suspension, ne sont pratiquement pas attaqués par la pepsine ou la pronase à 0,25 % alors que, sur coupes ultra-fines, ils sont digérés par ces mêmes enzymes à des concentrations plus faibles (voir Pl. XI, Fig. 32 à 34), sont difficiles à expliquer. Il est possible, en ce qui concerne ce dernier point, que l'attaque enzymatique sur coupes ultra-fines soit plus efficace du fait de la faible épaisseur des coupes ou de la dénaturation de la protéine au cours de la fixation et de la déshydratation comme l'ont suggéré SANDOZ et Coll. (1971) pour l'albumine de l'oeuf de poule. L'absence de digestion de la matrice protéinique des sphérules par ces deux enzymes sur coupes ultra-fines demeure toutefois obscure.

La dissolution des inclusions dans le tube digestif des larves de *Melolontha* commence au niveau de l'intestin moyen et se poursuit dans l'ampoule rectale comme l'indique l'action *in vitro* des sucs digestifs. La faible alcalinité de ces derniers (pH ≃ 8) ne peut rendre compte à elle seule de la dissolution des inclusions et il est certain que d'autres facteurs doivent intervenir dans ce processus de dégradation. Parmi ceux-ci l'action d'une ou de différentes enzymes protéolytiques est à envisager et une étude dans ce sens devrait être menée. Il est intéressant de noter que la dissolution observée au microscope photonique ne se produit pas de la même façon dans les sucs digestifs qu'en milieu minéral pur. En particulier, les sphérules se fissurent selon les lignes radiales puis se fractionnent en petits débris dans le premier cas alors qu'en milieu minéral elles se craquèlent à la périphérie et gonflent rapidement en perdant leur réfringence (voir section III B de ce chapitre et Pl. XXIII, Fig. 72 à 77). Cette différence traduit selon toute vraisemblance l'intervention de mécanismes distincts dans l'un et l'autre cas.

Les prélèvements de bol alimentaire suivant l'ingestion des

inclusions ont montré que cette dissolution est relativement lente *in vivo* et assez irrégulière d'un essai à l'autre. Il est possible qu'elle n'intéresse qu'une faible proportion des inclusions ingérées, la dissolution de quelques sphérules étant suffisante pour assurer l'infection.

Bien que nous ne possédions à l'heure actuelle aucune donnée précise sur les modalités de pénétration des virions, il est logique de penser qu'ils envahissent l'organisme en traversant la paroi intestinale au niveau de l'intestin moyen après dissolution des sphérules. L'étude de l'action des sucs digestifs sur la dissolution des sphérules et les essais de pouvoir infectant de préparations de sphérules purifiées (voir section II G de ce chapitre) sont en faveur de cette hypothèse. Le processus de dissolution des inclusions et de pénétration des virions dans les microvillosités de la paroi de l'intestin moyen d'insectes a été observé au cours d'autres maladies virales à corps d'inclusion (HARRAP et ROBERTSON, 1968 ; HARRAP, 1970 ; TANADA et LEUTENEGER, 1970 ; SUMMERS, 1969, 1971).

F - Composition chimique des inclusions

1 - Teneur en ARN et ADN

Les dosages ont été effectués sur des fuseaux et des sphérules purifiés et séparés comme indiqué précédemment (voir section III D de ce chapitre).

Après avoir essayé diverses techniques d'extraction des acides nucléiques par l'acide perchlorique ou trichloracétique, nous avons trouvé que la technique de SCHMIDT et THANNHAUSER (1945) qui fait intervenir une hydrolyse alcaline donnait les résultats les plus reproductibles du fait de l'insolubilité des inclusions dans les acides.

Les inclusions (entre 40 et 100 mg par échantillon) sont hydrolysées dans la potasse 1 N de 18 à 24 heures à 37°C (extraction de l'ARN) puis dans l'acide perchlorique 0,5 N pendant 20 minutes à 70°C (extraction de l'ADN). Les dosages sont réalisés selon la technique de MEJBAUM (1939) pour l'ARN et celle de GILES et MYERS (1965) pour l'ADN (voir chapitre II).

Les résultats de ces analyses consignés dans le tableau I indiquent une teneur moyenne en ARN des fuseaux de 3,10 µg/mg et de 0,70 µg/mg pour les sphérules. Seules ces dernières contiennent de l'ADN, à raison de 1,50 µg/mg d'inclusions.

Tableau I

TENEUR EN ARN ET ADN DES FUSEAUX ET DES SPHERULES

Echantillon	Sphérules			Fuseaux		
	Poids sec d'inclusions (mg)	ARN (µg / mg)	ADN (µg / mg)	Poids sec d'inclusions (mg)	ARN (µg / mg)	ADN (µg / mg)
I (1)	78,48	-	1,31	91,60	3,45	0
2 (2)	98,45	0,71	1,04	43,35	3,36	0
3 (1)	97,17	0,91	1,68	52,05	3,36	0
4 (2)	102,90	0,53	1,38	52,45	2,38	0
5 (1)	99,83	0,60	1,88	51,40	2,92	0
Moyenne		0,7	1,5		3,1	0

(1) Dosages sur fractions ARN et ADN séparés.
(2) Dosages sans séparation des fractions ARN et ADN.

2 - *Composition en acides aminés*

Dans une première étape, nous avons recherché la présence d'acides aminés dans les hydrolysats acides de mélange fuseaux-sphérules par la technique de chromatographie sur couches minces (voir chapitre I). Cette technique nous a permis de séparer et d'identifier 15 acides aminés différents (Pl. XIII, Fig. 39). Ces premiers résultats indiquaient nettement la nature au moins en partie protéinique des inclusions. Nous avons ensuite analysé quantitativement à l'aide d'un autoanalyseur d'acides aminés Technicon des hydrolysats de mélanges fuseaux-sphérules et de fuseaux et de sphérules séparées. Les résultats de ces analyses sont consignés dans le tableau II.

Tableau II

COMPOSITION EN ACIDES AMINES DES FUSEAUX ET DES SPHERULES (1)

Acides aminés	Mélange (2)	Fuseaux (3)	Sphérules (2)
lysine	7,4	5,9	9,1
histidine	3,4	3,6	2,2
arginine	6,6	5,8	4,4
acide aspartique	15,2	16,6	13,8
thréonine	4,5	4,3	5,4
sérine	3,0	2,4	3,9
acide glutamique	10,6	12,8	9,8
proline	4,4	6,2	4,3
glycine	2,6	2,5	2,8
alanine	2,3	2,7	2,0
cystine	6,3	5,0	5,8
valine	4,5	4,4	4,6
méthionine	1,6	1,7	1,4
isoleucine	5,8	5,2	6,7
leucine	5,9	3,8	8,8
tyrosine	10,4	10,7	9,8
phenylalanine	4,4	4,2	4,2
tryptophane (4)	1,2	2,2	1,0
g. de résidus d'acides aminés pour 100 g. d'inclusions	85,1	94,6	98,2
% d'azote calculé dans les inclusions	13,2	14,35	14,7
% d'azote mesuré dans les inclusions	13,97	15,15	15,0
% de protéine calculé	90,4	99,8	100,4

(1) Résidus d'acides aminés exprimés en pourcentage de leur somme
(2) Moyenne de 3 analyses
(3) Moyenne de 6 analyses
(4) Déterminé par la méthode à la p-diméthylaminobenzaldéhyde.

Bien que les deux types d'inclusions renferment les mêmes résidus d'acides aminés, leurs proportions respectives ne sont pas toujours les mêmes selon qu'il s'agit des fuseaux et des sphérules. La variation la plus importante se situe au niveau des résidus leucine dont la concentration est 2,3 fois plus grande dans les sphérules que dans les fuseaux. Les autres différences sont plus faibles, cependant les sphérules contiennent plus de résidus thréonine, sérine, isoleucine et lysine que les fuseaux, ces derniers renferment plus de résidus glutamique, aspartique, proline, tryptophane, histine et arginine.

Les deux types d'inclusions ont une teneur élevée en résidus d'acides aminés aromatiques (16 % en moyenne), la tyrosine représentant à elle seule 10,2 % en moyenne de la somme des résidus. Leur teneur en résidus cystine est également assez élevée : 5,8 % pour les sphérules et 5 % pour les fuseaux.

Le poids d'acides aminés retrouvés à l'analyse représente 94,56 % du poids sec de fuseaux hydrolysés et 98,20 % du poids de sphérules. Ce poids représente seulement 85,12 % du poids d'inclusions hydrolysées dans le cas du mélange. Cette différence tient probablement à la présence d'impuretés non protéiniques éliminées dans les étapes ultérieures de séparation des fuseaux et des sphérules. En effet, la teneur en azote de ce mélange est plus faible (13,97 %) que celle trouvée pour les fuseaux (15,15 %) et les sphérules (15,04 %). Cette teneur est en bonne concordance avec le pourcentage d'azote calculé sur la base des résidus d'acides aminés retrouvés à l'analyse, compte tenu des pertes au cours des hydrolyses.

3 - *Etude dans l'ultra-violet des protéines de fuseaux et de sphérules*

a - Préparation des protéines

Les fuseaux et les sphérules sont dissous à température ambiante dans le tampon thioglycolate-bicarbonate 0,125 M de pH compris entre 10,5 et 11,25. Les fuseaux à la concentration de 1 à 5 mg/ml sont laissés en contact avec le tampon pendant 10 minutes sous agitation, temps au bout duquel ils sont pratiquement tous dissous, ainsi que l'indique la disparition de turbidité de la solution. La dissolution des sphérules est suivie au

microscope optique et la suspension est centrifugée dès que les premières sphérules éclatent (voir section III B de ce chapitre). Les solutions de protéines de fuseaux et de sphérules sont centrifugées à 48.000 g pendant 15 minutes. Les surnageants sont dialysés à 4°C contre 100 fois leur volume de tampon glycine-soude 0,1 M pH 8,86. Le tampon est renouvelé 2 fois à 24 heures d'intervalle. Il est important d'éliminer toute trace de thioglycolate qui absorbe fortement dans l'ultra-violet.

Pour les analyses quantitatives, les solutions de protéines dialysées sont précipitées par addition, sous agitation et contrôle du pH, d'HCl 0,1 N. La précipitation a lieu aux environs de pH 6,5-6,7, valeur à laquelle doit se situer le point isoélectrique de ces protéines. Les solutions sont laissées décanter à 4°C 2 heures au minimum puis centrifugées 10 minutes à 48.000 g. Les surnageants sont éliminés et les culots lyophilisés jusqu'à poids constant. Des solutions de concentration connue sont préparées en dissolvant ces protéines dans le tampon glycine-soude.

b - Spectres d'absorption dans l'ultra-violet

Les solutions de protéines de fuseaux et de sphérules dans le tampon glycine-soude 0,1 M à pH 8,86 ont des spectres d'absorption dans l'ultra-violet caractéristiques de protéines et pratiquement identiques (Pl. XIV et XV, Fig. 40 et 42). Leur maximum se situe à 277 nm et leur minimum à 251 nm.

Si l'on compare les spectres de ces protéines à celui d'une solution de sérum albumine bovine dans le même tampon, on ne remarque pas de différence qualitative notoire, les maxima et les minima étant situés sensiblement aux mêmes longueurs d'onde (Pl. XIV, Fig. 41). Toutefois, à concentration égale, l'absorption des protéines de fuseaux et de sphérules est beaucoup plus forte. Ainsi, la densité optique d'une solution de sérum albumine bovine à la concentration de 1 mg/ml mesurée dans une cuve de 1 cm de trajet optique est de 0,6 à 277 nm alors qu'elle est respectivement de 1,6 et 1,7 pour la protéine des sphérules et celle des fuseaux.

Ces spectres d'absorption ne sont pas modifiés par les conditions préalables de solubilisation des inclusions dans les limites que nous avons définies. Ainsi, l'allure des spectres (position des maxima et des

minima) n'est pas modifiée, que la solubilisation des fuseaux et des sphérules ait eu lieu entre pH 10,5 et pH 11,25 dans un tampon thioglycolate de molarité comprise entre 0,0625 M et 0,25 M pendant des temps allant de 10 à 30 minutes. Par contre, si l'on utilise des tampons de différents pH pour resolubiliser ces protéines leur spectre se modifie. Nous l'avons vérifié en réalisant le spectre de ces protéines à différents pH, entre pH 8,0 et pH 12. A partir de pH 10, on observe un glissement du maximum d'absorption vers des longueurs d'onde plus grandes. Pour la protéine des fuseaux par exemple, le maximum se situe à 284 nm et le minimum à 270 nm lorsqu'elle est dissoute dans une solution de soude à pH 12,0 (Pl. XV, Fig. 43).

4 - *Discussion*

La mise en évidence d'acides nucléiques dans les fuseaux et les sphérules appelle un certain nombre de remarques quant à leur nature et à leur signification. Le génome viral étant un ADN (voir section III C de ce chapitre), il est logique de penser que l'ADN dosé dans les sphérules est celui contenu dans les virions qu'elles renferment. Pour la même raison, l'absence d'ADN dans les fuseaux n'a rien d'étonnant si l'on considère qu'ils ne renferment pas de virions. La présence en proportion différente d'ARN dans les fuseaux et les sphérules est par contre plus difficile à expliquer.

Chez les baculovirus, plusieurs auteurs ont démontré la présence d'ARN dans les inclusions de type polyèdres et granules qui, rappelons le, renferment des virus à ADN (TARASSEVITCH, 1946 ; YAGI et al., 1951 ; FAULKNER, 1962 ; AIZAWA et IIDA, 1963 ; FAUST et ESTES, 1965 ; ESTES et IGNOFFO, 1965 ; FAUST, 1966 ; SHVEDTCHIKOVA et TARASSEVITCH, 1966). La teneur en ARN de ces inclusions varie d'un virus à l'autre (voir tableau III) et pour un même virus , selon la souche considérée (AIZAWA et IIDA, 1963 ; TARASSEVITCH et al., 1966). Pour les polyèdres du baculovirus de *Bombyx mori*, FAULKNER (1962) a démontré que l'ARN était partie intégrante des inclusions et a suggéré qu'il pouvait s'agir d'un ARN de type messager impliqué soit dans la synthèse de l'ADN viral, soit dans celle d'une protéine du virion ou de l'inclusion. HIMENO et ONODERA (1969) ont analysé cet ARN et montré que son coefficient de sédimentation $S_{W20} = 7,25$ était comparable à celui de l'ARN messager présent dans les cellules d'*E. coli* infectées par le phage T2. Le

taux de synthèse de cet ARN étant maximum 4 jours après l'infection, période de synthèse active des polyèdres, ils en déduisent qu'il doit s'agir d'un ARN messager responsable de la synthèse de la protéine du corps d'inclusion. Enfin, pour TARASSEVITCH et Coll. (1966), cet ARN serait un facteur essentiel du pouvoir infectieux des polyèdres.

Tableau III

TENEUR COMPAREE EN ARN ET ADN
DES INCLUSIONS DE BACULOVIRUS ET D'ENTOMOPOXVIRUS

Type de virus et d'inclusions		ARN µg / mg	ADN µg / mg	Références
BACULOVIRUS	- Polyèdres			
	Bombyx mori	5,7	5,8	FAULKNER (1962)
	Trichoplusia ni	8,7	12,2	FAUST et ESTES (1965)
	Heliothis zea	2,0	6,8	ESTES et IGNOFFO (1965)
	Spodoptera exigua	12,7	23,7	FAUST (1966)
	- Granules			
	Dendrolimus sibericus	8,0	0,2	SHVEDTCHIKOVA et TARASSEVITCH (1966)
ENTOMOPOXVIRUS	*Melolontha*			
	Fuseaux	3,1	0	
	Sphérules	0,7	1,5	
	Amsacta			
	Sphérules	2,4	3,9	

Les ARN dosés dans les fuseaux et les sphérules sont, selon toute vraisemblance, des constituants normaux des inclusions et non pas des contaminants. L'hypothèse de la contamination en surface des fuseaux par les ribosomes des citernes ergastoplasmiques qui les renferment ne peut être

totalement exclue mais semble peu probable compte tenu des conditions de purification de ces inclusions (voir section II D de ce chapitre). Nous ne savons pas, à l'heure actuelle, qu'elle est leur nature ni leur origine mais l'hypothèse selon laquelle il s'agirait d'ARN messagers impliqués dans la synthèse des protéines de ces inclusions et incorporés aux cristaux au cours de leur croissance nous paraît la plus satisfaisante. Ces ARN ne sont pas infectieux et n'ont aucun rôle essentiel dans les processus d'infection ainsi que nous le verrons plus loin.

Les résultats de l'analyse quantitative des acides aminés des fuseaux et des sphérules démontrent la nature essentiellement protéinique de ces inclusions, la teneur en acides aminés représentant respectivement 95 % et 98 % de leur poids sec. Ils font aussi apparaître des différences dans la teneur en certains résidus indiquant qu'il s'agit de protéines différentes. En effet, ces différences ne peuvent s'expliquer par la seule présence dans les sphérules de protéines constitutives du virion dont les résidus ne représentent qu'un faible pourcentage du poids total de ces inclusions. Ainsi que nous l'avons mentionné précédemment (section II D de ce chapitre), les sphérules rappellent par certains aspects les corps d'inclusions de virus d'autres maladies d'insectes. Ces inclusions sont également de nature protéinique et la composition en acides aminés de leur protéine a été analysée par différents auteurs (DESNUELLE et al., 1943 ; DESNUELLE et CHANG, 1943, 1945 ; YOSHITAKE et ARUGA, 1951 ; WELLINGTON, 1951, 1954 ; BERGOLD et WELLINGTON, 1954 ; KAWASE, 1964). Les données les plus récentes concernent les protéines des polyèdres cytoplasmiques (souches hexagonales et icosaédriques) et nucléaires de *Bombyx mori* L. (KAWASE, 1964).

Il est intéressant de comparer la composition de ces protéines à celles des fuseaux et des sphérules (tableau IV). Pour une comparaison plus facile, les acides aminés ont été groupés par catégorie, sauf pour les résidus dont les différences sont importantes. La composition des sphérules est, dans l'ensemble, assez proche de celle de la protéine des polyèdres nucléaires de *B. mori*. Toutefois, la teneur en résidus cystine de ces inclusions est nettement supérieure (5,6 %) à celle des différentes protéines des polyèdres de *B. mori* qui n'atteint pas 1 %. Cette différence explique au moins en partie la raison de l'insolubilité des sphérules, comme des fuseaux d'ailleurs, dans les solutions alcalines couramment utilisées pour dissoudre les

protéines des polyèdres (voir section II E de ce chapitre) et le rôle des composés réducteurs dans leur solubilisation. En effet, les ponts disulfure des protéines de ces inclusions ne peuvent être rompus dans ces solutions et l'adjonction d'agents réducteurs comme le thioglycolate de sodium ou le 2-mercaptoéthanol a donc pour effet d'ouvrir ces ponts en déplaçant l'équilibre de la réaction vers la forme réduite et de permettre ainsi leur solubilisation.

La forte absorption dans l'UV des protéines de fuseaux et de sphérules tient à leur teneur élevée en résidus d'acides aminés aromatiques (17,1 et 15,0 respectivement), particulièrement en tyrosine qui représente à elle seule 10,2 % en moyenne du poids total des résidus d'acides aminés retrouvés à l'analyse (Cf. tableaux III et IV). On sait en effet que la présence dans les chaînes polypeptidiques de résidus des 3 acides aminés à noyau aromatique : tryptophane, tyrosine et phénylalanine dont les maxima d'absorption se situent respectivement à 280, 275 et 258 nm est responsable de leur absorption spécifique dans l'UV. Pour une protéine donnée, la teneur et les proportions relatives en ces trois résidus d'acides aminés ainsi que leur état d'ionisation déterminent son coefficient d'extinction spécifique ainsi que la position du ou des pics.

La forte teneur en résidus tyrosine est également responsable de la dérive des maxima d'absorption vers des longueurs d'onde plus grandes en milieu alcalin de pH $\geqslant$ 10. Celle-ci résulte de la dissociation des résidus phénol de la tyrosine (pk = 10,1) pour former des anions phénolate dont le maximum d'absorption se situe à des longueurs d'onde plus grandes.

L'ensemble des données sur la composition en acides aminés des fuseaux et des sphérules et l'analyse en spectrophotométrie UV de leurs produits de dissolution ne permettent pas de savoir combien d'espèces chimiques sont impliquées dans la structure de ces inclusions. Il est possible de penser qu'à la structure cristalline homogène des fuseaux en microscopie électronique correspond la répétition d'une même "sous-unité", c'est-à-dire d'une même protéine. Etudiant la composition antigénique des fuseaux et des sphérules, CROIZIER et VEYRUNES (1971) en arrivent à cette conclusion. En ce qui concerne les sphérules, le problème est plus complexe du fait de la contamination des préparations par des protéines virales au moment de la disso-

lution de ces inclusions (voir section III B de ce chapitre), contamination constatée par ces auteurs.

Tableau IV

REPARTITION QUANTITATIVE DES ACIDES AMINES
DANS LES FUSEAUX, LES SPHERULES ET LES POLYEDRES
DE *Bombyx mori* (1) (2)

Acides aminés	Fuseaux	Sphérules	PN (3)	PCH (4)	PCI (5)
non polaires aliphatiques	18,6	24,9	25,8	29,4	31,6
leucine	3,8	8,8	8,1	7,3	8,1
acides aminés hydrcxylés	6,7	9,3	7,3	9,4	9,6
proline	6,2	4,3	4,8	9,1	2,9
acides aminés acides	29,4	23,6	25,6	23,6	24,6
acides aminés basiques	15,5	15,7	16,9	14,2	14,1
acides aminés aromatiques	17,1	15,0	16,8	18,1	15,1
acides aminés soufrés	6,7	7,2	2,8	2,1	2,1
cystine	5,0	5,8	0,9	0,7	0,9

(1) résidus d'acides aminés exprimés en pourcentage de leur somme
(2) valeurs calculées d'après les données de KAWASE (1964)
(3) protéine des polyèdres nucléaires de *B. mori*
(4) " " " cytoplasmiques hexaédriques de *B. mori*
(5) " " " " icosaédriques de *B. mori*.

L'analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide et par gel filtration des produits de solubilisation des fuseaux et des sphérules ainsi que l'analyse des résidus C et N terminaux devraient permettre de dénombrer les espèces chimiques intervenant dans leur constitution.

G - Essais de pouvoir infectant des suspensions purifiées de fuseaux et de sphérules. Essais de toxicité de leurs protéines

1 - *Inclusions figurées*

Nous avons étudié le pouvoir infectant des suspensions purifiées de fuseaux et de sphérules administrées sous deux formes différentes :

- inoculation dans la cavité viscérale,
- ingestion forcée.

Dans les deux cas, le volume de suspension administré était de 0,1 ml/larve (voir chapitre I). Tous les essais ont été réalisés avec de jeunes larves L_3. La concentration des suspensions était de 2 mg/ml d'inclusions de l'un ou de l'autre type, ce qui correspond à environ 1×10^7 sphérules et $1,3 \times 10^7$ fuseaux par ml. Les témoins ont été inoculés avec de l'eau physiologique stérile. Les résultats de ces essais sont consignés dans le tableau V.

Tableau V

ESSAIS DE POUVOIR INFECTANT DES SUSPENSIONS PURIFIEES DE FUSEAUX ET DE SPHERULES (1)

Suspension utilisée	Essais par inoculation			Essais par ingestion forcée		
	Nbre de larves	Mortalité (2)	Larves virosées (3)	Nbre de larves	Mortalité (2)	Larves virosées (3)
Suspension de sphérules	36	5	18	37	3	35
Suspension de fuseaux	41	2	1	39	4	0
Eau physiologique (Témoins)	20	1	0			

(1) Résultats de deux séries de mesures
(2) Mortalité en cours d'expérience
(3) Nombre total de larves infectées par le virus au bout de 2 mois.

2 - *Protéines d'inclusions*

Les protéines de fuseaux et de sphérules préparées comme indiqué précédemment (voir section II F de ce chapitre) ont été inoculées à de jeunes larves L_3 à la concentration de 1 mg/ml. Comme pour les essais précédents, chaque larve a reçu 0,1 ml de solution de protéines et les témoins la même dose d'eau physiologique stérile. Afin d'éviter toute contamination des solutions par les virions, ces dernières ont été filtrées sur filtre Millipore de porosité 0,22 µ. Les résultats de ces essais figurent dans le tableau VI.

Tableau VI

ESSAIS DE TOXICITE DES PROTEINES PURIFIEES
DE FUSEAUX ET DE SPHERULES (1)

Solution utilisée	Nombre de larves	Mortalité (2)	Larves virosées (3)
Protéine sphérules	40	2	0
Protéine fuseaux	27	2	0
Eau physiologique (Témoins)	20	1	0

(1) Résultats de deux séries de mesures
(2) Mortalité en cours d'expérience
(3) Larves infectées au bout de 2 mois.

3 - *Discussion*

Une différence très nette apparaît entre les suspensions de sphérules d'une part qui sont infectieuses à la fois par inoculation et *per os* et celles de fuseaux qui, à l'exception d'un cas, ne peuvent reproduire la maladie.

Selon le mode d'administration des suspensions de sphérules le pourcentage de larves infectées est différent. Il est d'environ 95 % dans les essais par ingestion forcée. Ce mode d'infection se rapproche le plus de la voie de propagation de la maladie dans les conditions naturelles. HURPIN et ROBERT (1967, 1969) ont en effet montré que l'infection des larves au laboratoire peut être réalisée par contamination du substrat d'élevage et que la maladie peut être introduite dans une population naturelle de vers blancs en enterrant dans le sol des cadavres de larves atteintes de virose. Ainsi que nous en avons émis l'hypothèse précédemment (voir section E 6 de ce chapitre), l'infection se produit, selon toute vraisemblance, par passage des virions à travers la paroi de l'intestin moyen après dissolution des sphérules dans la lumière intestinale.

Le taux d'infection obtenu en inoculant les suspensions de sphérules est moins important mais il atteint cependant 50 %. Le processus d'infection dans ce cas est plus difficile à expliquer. Etant donné les traitements auxquels sont soumises les sphérules au cours de leur purification : ultrasons, délipidation dans le mélange alcool-éther, etc. (voir section II D de ce chapitre), il est peu vraisemblable que des virions libres ou partiellement inclus se trouvent à leur surface. D'ailleurs, les micrographies de sphérules observées au microscope à balayage (Pl. V, Fig. 17 et 18) montrent des trous à la place des virions partiellement inclus dans les sphérules incomplètes et des surfaces lisses pour les sphérules complètes. De même, nous n'avons jamais observé de virions libres dans des coupes ultra-fines de culots de sphérules purifiées. Il faut donc admettre que les sphérules sont dégradées dans le milieu intérieur de l'insecte et que certains virions échappant aux processus de dégradation sont susceptibles de déclencher des foyers d'infection. Si un tel phénomène se produit il doit être exceptionnel étant donné la quantité importante de sphérules inoculées et le pourcentage comparativement faible d'infection obtenu. Une étude détaillée du sort des sphérules inoculées devrait apporter une réponse à cette question.

Les inoculations et ingestions forcées de fuseaux n'ont été suivies d'aucun symptôme pathologique décelable. Le seul cas d'infection observé dans l'un des lots inoculés est, selon toute vraisemblance, dû à une contamination de la suspension par quelques petites sphérules. Ces résultats indiquent donc que les fuseaux ne sont ni infectieux ni toxiques pour les

larves. Ils n'interviennent pas non plus dans les processus d'infection qui se déroulent en leur absence. Comme pour les sphérules, il serait intéressant de suivre le sort des fuseaux inoculés.

Enfin, qu'il s'agisse de protéine de fuseaux ou de sphérules, aucune mortalité anormale n'est apparue dans les lots inoculés. Au moment de leur dissection les larves ne présentaient aucun symptôme pathologique. Ces résultats indiquent l'absence de fraction subvirale infectieuse dans les préparations de protéine de sphérules et l'absence de caractère toxique des protéines des deux types d'inclusions inoculées sous forme non cristallisée.

H - Conclusions

L'ensemble des données sur la structure, le mode de développement, les propriétés physico-chimiques et la composition chimique des inclusions associées à l'entomopoxvirus de *Melolontha* permet de reconnaître les fuseaux comme des entités distinctes des sphérules. L'analyse immunochimique de ces inclusions réalisée par CROIZIER et VEYRUNES (1971) a d'autre part montré l'absence de communauté antigénique de leurs protéines et amené ces auteurs à la conclusion que l'hypothèse selon laquelle les sphérules dériveraient des fuseaux par voie d'élargissement de certains d'entre eux ne peut être retenue (AMARGIER et al., 1964 ; WEISER, 1965). Les résultats de l'étude ultrastructurale des fuseaux et de leur mode de développement confirment ces conclusions que l'on doit étendre vraisemblablement à d'autres maladies à entomopoxvirus pour lesquelles des hypothèses semblables ont été formulées (GOODWIN et FILSHIE, 1969 ; WEISER et VAGO, 1966).

Nos connaissances actuelles sur ces inclusions ne nous permettent pas de résoudre le problème de l'origine de l'information génétique présidant à leur synthèse. Si l'on peut logiquement penser que la synthèse des sphérules, à l'image de celle des inclusions de type A des poxvirus de vertébrés (voir chapitre V) ou des polyèdres et des granules est contrôlée par le génome viral (GERSHENSON, 1957 ; STAIRS, 1964), on ne peut en dire autant des fuseaux. Nous ne possédons à l'heure actuelle qu'un petit nombre d'éléments en faveur de cette hypothèse, comme le maintien de la forme caractéristique des fuseaux lors de l'infection par le virus d'espèces voisines

de *Melolontha* (HURPIN et ROBERT, 1967 et communication personnelle) ou de leur forme typique chez d'autres entomopoxvirus auxquels ils sont associés (voir chapitre IV).

L'observation fréquente dans des cellules fortement atteintes de matériel accumulé dans l'espace périnucléaire (Pl. XII, Fig. 37) et plus exceptionnellement d'un fuseau entre les deux membranes nucléaires ou à l'intérieur d'un noyau (Pl. XII, Fig. 35 et 36) suggérerait au contraire l'existence de relations entre génome cellulaire et synthèse des fuseaux. D'autre part, si l'on admet que les inclusions fusiformes cytoplasmiques que l'on a décrites dans certaines cellules d'insectes infectées avec des virus de polyédroses nucléaires (voir section II C de ce chapitre) sont également l'expression du génome viral, il faut admettre que des virus aussi différents que les entomopoxvirus et les baculovirus (virus de polyédroses nucléaires) possèdent le même type d'information génétique, ce qui est peu probable. Il n'est toutefois pas exclu que cette convergence dans le mode de cristallisation de ces protéines soit due à des conditions propres aux cellules d'insectes.

Des inclusions cristallines se développant dans des citernes ergastoplasmiques ont été décrites dans des tissus sains ou malades de plusieurs espèces animales ou végétales (GOURRET, 1970 ; MARQUET et SOBEL, 1969) indiquant qu'il s'agit d'un mode relativement répandu de réponse cellulaire à des conditions métaboliques variées. Selon les cas, on a attribué à ces inclusions des significations variées : stockage de produits de réserves, accumulation de produits de sécrétion, etc. En ce qui concerne les fuseaux, si l'on peut affirmer qu'il s'agit d'une synthèse anormale de protéine(s) due à la présence du virus dans les cellules, leur signification demeure obscure. Nous n'avons jamais pu mettre en évidence de relations entre le développement des fuseaux et le cycle de multiplication virale (voir section IV de ce chapitre), aussi bien dans les cellules adipeuses que dans les hémocytes. Ils ne sont ni infectieux, ni toxiques par ingestion ou inoculation à l'état cristallisé ou dissous et leur analyse immunochimique a montré qu'ils ne correspondent pas à l'accumulation d'antigènes structuraux des virions (CROIZIER et VEYRUNES, 1971). On sait enfin que les fuseaux manquent dans certaines maladies à entomopoxvirus (voir chapitre IV). Ils n'apparaissent donc pas indispensables au développement normal des virus appartenant à ce groupe. Selon

que l'on admet l'hypothèse de l'origine virale ou cellulaire des fuseaux, le défaut de leur synthèse est dû à l'absence ou à l'inhibition de gènes viraux ou cellulaires. Des expériences d'infections croisées et d'infections doubles avec différentes souches d'entomopoxvirus devraient permettre de déterminer laquelle des deux hypothèses doit être retenue.

III - LE VIRION

A - Structure du virion

Nous avons étudié la structure du virion au microscope électronique soit sur des particules purifiées colorées par contraste négatif à l'acide phosphotungstique (APT) soit sur des coupes ultra-fines de cellules adipeuses.

1 - Observations en contraste négatif

Les virions purifiés par dissolution des sphérules et observés après coloration négative ont une forme ovoïde, ils mesurent environ 2.500 Å de large et 4.000 Å de long. Leur surface est bosselée, donnant aux virions un aspect mûriforme (Pl. XVI, Fig. 44). Cet aspect est dû à des éléments globuleux d'environ 220 Å de diamètre disposés côte à côte sans ordre défini à la surface des particules. A côté de ces particules, on en observe également d'autres légèrement plus grandes à l'intérieur desquelles l'APT a pénétré (Pl. XVI, Fig. 45). Leur structure interne se trouve de ce fait révélée et l'on distingue à l'intérieur d'une enveloppe une structure en forme de sac, le nucléoïde, occupant une position centrale. Sur un côté de la particule, une substance dense aux électrons forme un corps latéral. L'enveloppe de ces particules a un contour festonné, les ondulations correspondant aux boursouflures observées à la surface des virions intacts.

Certains virions sont endommagés par un contact prolongé avec le tampon thioglycolate lors de la dissolution des sphérules. C'est ainsi que l'on rencontre dans ces suspensions des particules virales à différents stades

de dégradation :

- des virions dont l'enveloppe déchirée laisse échapper le nucléoïde (Pl. XVI, Fig. 46) ;

- des virions dont le corps latéral et le nucléoïde sont sortis de l'enveloppe. On observe à la surface des nucléoïdes libres de petites sous-unités tubulaires d'environ 60 Å de diamètre (Pl. XVI, Fig. 47) ;

- des enveloppes vides à la surface desquelles on distingue les protubérances sphériques caractéristiques des particules intactes qui se sont affaissées (Pl. XVI, Fig. 50). D'autres présentent de nombreuses digitations invaginées ou évaginées (Pl. XVI, Fig. 48). L'observation de différentes formes de transition (Pl. XVI, Fig. 49) suggère que ces formations résultent du gonflement des boursouflures du manteau sous l'action du thioglycolate.

L'aspect des virions purifiés directement à partir du tissu adipeux (virions libres) et observés en coloration négative est le même que celui des particules isolées à partir des sphérules. Outre les particules d'aspect mûriforme, on reconnaît aussi dans ces préparations des particules pénétrées par l'APT, des nucléoïdes et des enveloppes libres. Toutefois, ces dernières ne présentent jamais les structures en doigt de gant décrites ci-dessus, ce qui confirme le rôle du thioglycolate dans leur apparition.

2 - *Observations sur coupes ultra-fines*

a - Structure des virions inclus dans les sphérules

Les coupes de sphérules incluses dans l'épon et contrastées par la double coloration à l'acétate d'uranyle alcoolique et au citrate de plomb fournissent un excellent matériel pour l'étude de la structure fine des virions. Sur de telles coupes (Pl. XVII et XVIII, Fig. 51 et 52), les virions apparaissent régulièrement répartis à l'intérieur du réseau cristallin formant l'inclusion. Ils ont une forme ovale en sections longitudinales et à peu près ronde en sections transversales. L'intérieur du virion est occupé par une structure excentrique de forte opacité aux électrons, le nucléoïde. Celui-ci se présente sous la forme d'un sac, unilatéralement concave

et réniforme en coupe longitudinale, délimité par une coque de 150 Å d'épaisseur totale. Cette coque est formée d'une couche sombre entourée de 2 couches claires plus épaisses, l'externe mesurant approximativement 80 Å d'épaisseur.

A l'intérieur du nucléoïde s'observe une structure filamenteuse d'environ 200 Å d'épaisseur et d'opacité aux électrons plus faible que la substance qui l'entoure. Elle se présente généralement sur les coupes longitudinales de virions sous la forme de deux ou trois filaments occupant toute la longueur du nucléoïde. Certaines images suggèrent qu'il s'agirait en fait d'un filament unique replié sur lui-même (Pl. XIX, Fig. 53 et 54).

Sur les coupes transversales de virions, on observe, au sein de la substance remplissant le nucléoïde, des masses circulaires claires de 200 Å de diamètre, au nombre de 4 à 6, présentant dans leur centre une tache sombre punctiforme (Pl. XIX, Fig. 55). Ces masses, qui ont le même diamètre que la structure filamenteuse, correspondent à des sections transversales de celle-ci.

Une substance d'opacité moyenne aux électrons et d'épaisseur relativement réduite entoure le nucléoïde. Elle forme dans la concavité de celui-ci un corps latéral lenticulaire biconvexe. La structure fine de l'enveloppe des virions inclus dans les sphérules est difficile à observer. Certaines images suggèrent qu'elle serait formée de plusieurs feuillets mais cette apparence semble résulter de la superposition en coupes épaisses de plusieurs contours festonnés. Les virions présentent en effet une surface bosselée soulignée par une mince couche claire, la distance entre deux bosses étant d'environ 250 Å. Ces bosses, qui représentent l'ornementation externe de l'enveloppe, sont particulièrement bien visibles sur les coupes tangentielles de virions (Pl. XVIII, Fig. 52).

La trame cristalline de la protéine des sphérules n'atteint pas la surface des virions, une substance indifférenciée formant un hâlo clair autour des particules. Suivant le type de fixation ou d'inclusion, ce hâlo est plus ou moins bien caractérisé. Ainsi, sur des coupes de tissu adipeux fixé à l'acide osmique seul et inclus en épon, le hâlo est à peine visible autour des virions (Pl. XIX, Fig. 53). Après fixation dans le glutaraldéhyde seul et inclusion en GMA, le hâlo est très régulier et relativement mince si

on le compare à celui observé dans le matériel ayant subi la double fixation et l'inclusion en épon (Pl. XIX, Fig. 55 et 56).

b - Structure des virions libres

Les formes mûres de virions libres observées dans le cytoplasme des cellules adipeuses ont sensiblement la même structure que les virions inclus. On note toutefois des différences intéressant le nucléoïde dont la substance fondamentale présente une structure fibrillaire au sein de laquelle on n'observe jamais la structure filamenteuse caractéristique des formes incluses (Pl. XIX, Fig. 58). La surface des virions est d'autre part irrégulière et l'ornementation de l'enveloppe ne se distingue pas nettement.

c - Reconstitution de la structure tridimensionnelle par la technique des coupes sériées

Sur une même coupe ultra-fine de sphérule, les virions sont sectionnés suivant des plans différents et à différents niveaux d'un même plan (Pl. XVII et XVIII, Fig. 51 et 52). Leur grande taille permet de suivre un même virion dans plusieurs coupes successives (jusqu'à 6 coupes). Il est possible ainsi d'étudier sur coupes sériées la structure des virions à différents niveaux de différents plans et de reconstituer ainsi leur configuration tridimensionnelle.

Dans les coupes sériées longitudinales (Pl. XX, Fig. 60 a-e) le virion est de forme ovale avec une convexité plus marquée du côté du corps latéral. La structure filamenteuse du nucléoïde se reconnaît bien sur la coupe passant à peu près exactement par le plan de symétrie longitudinale de la particule (Pl. XIX, Fig. 60 c). La concavité du nucléoïde du côté du corps latéral est plus marquée que sa convexité du côté opposé. Le contour des sections transversales de virions est à peu près circulaire avec également une légère déformation du côté du corps latéral (Pl. XX, Fig. 59 a-b). Cette déformation est maximale au niveau de la plus grande épaisseur du corps latéral, correspondant au plan de symétrie transversale (Pl. XX, Fig. 59 c). A ce niveau les sections circulaires de la structure filamenteuse se distinguent nettement. Elles sont disposées dans un plan sensiblement horizontal (perpendiculaire au plan de symétrie longitudinale) et cette disposition explique

qu'il soit rare de trouver plus de deux filaments dans les coupes longitudinales. Les figures 61 et 62 (Pl. XX) représentent des coupes sériées de deux particules dans des plans à peu près horizontaux. Ces coupes indiquent une forme rectangulaire du virion dans ce plan. Le corps latéral n'est plus visible et la coque du nucléoïde suit régulièrement le contour de la particule. Sur la figure 61, on peut dénombrer 4 éléments de la structure filamenteuse dans le nucléoïde confirmant ainsi la disposition de cette structure dans ce plan (voir également Pl. XIX, Fig. 57).

L'ensemble des données présentées ci-dessus nous a permis d'établir un modèle de virion représenté sur la figure 63 (Pl. XXI). Ce schéma, bien que ne donnant pas tous les détails de la structure, rend compte des différents aspects sous lesquels apparaissent les virions sur les nombreuses micrographies que nous avons étudiées.

3 - *Etude cytochimique du virion*

Afin de préciser la nature chimique de certaines structures du virion, nous avons fait appel à des techniques de coloration spécifique de l'ADN et des glycoprotéines ainsi qu'à des digestions enzymatiques.

a - Colorations spécifiques

La coloration préférentielle de l'ADN selon BERNHARD (1969) effectuée sur coupes en GMA fait apparaître une forte imprégnation de la substance contenue dans le nucléoïde par les sels d'urane après formation d'un complexe entre la RNase et l'ADN (effet YOTSUYANAGI) (Pl. XXII, Fig. 64). Toutefois, la structure filamenteuse apparaît peu colorée par rapport à la substance l'entourant. La technique de CHARRET (1969) reposant également sur le principe de la coloration du complexe spécifique RNase-ADN, appliquée sur coupes en épon après fixation au glutaraldéhyde seul, fournit un résultat semblable (Pl. XXII, Fig. 65). La substance fondamentale du nucléoïde est fortement colorée tandis que les sections de la structure filamenteuse apparaissent beaucoup moins contrastées.

La coloration des glycoprotéines selon la technique de RAMBOURG (1967) sur coupes en GMA contraste nettement le hâlo entourant les

virions ainsi que l'intérieur du nucléoïde (Pl. XXII, Fig. 66). Ce dernier se colore intensément par cette réaction si elle est précédée d'un traitement à la DNase à 0,1 % pendant 30 minutes (Pl. XXII, Fig. 68).

b - Digestions enzymatiques sur coupes ultra-fines

Ces colorations ont été complétées par des digestions à la DNase sur coupes. Après 30 à 120 minutes d'action de l'enzyme sur coupes en GMA, les particules présentent un centre creux correspondant à la digestion du matériel contenu dans le nucléoïde (Pl. XXII, Fig. 66). La substance de densité moyenne qui entoure le nucléoïde n'est pas digérée. Les coupes traitées dans les mêmes conditions mais sans DNase montrent un nucléoïde intensément coloré par l'acétate d'urane (Pl. XXII, Fig. 67).

Enfin, nous avons fait agir sur des coupes ultra-fines deux enzymes protéolytiques, la pepsine et la pronase. La pepsine utilisée à faible concentration (0,01 %) pendant une demi-heure produit une attaque partielle des virions intéressant surtout la substance entourant le nucléoïde (Pl. XXII, Fig. 70). A plus forte concentration (0,1 %) la digestion des particules est totale (Pl. XXII, Fig. 71). L'action de la pronase est comparable à celle de la pepsine, les structures les plus précocement dégradées étant le corps latéral et la substance périnucléaire. Ces deux enzymes semblent n'avoir aucun effet sur la protéine cristallisée de la sphérule.

4 - *Discussion*

L'étude en coloration négative et en coupes ultra-fines des particules mûres de l'entomopoxvirus de *Melolontha* a permis d'élucider la complexité de leur architecture et de compléter ainsi les premières descriptions de ce virus (VAGO, 1963 ; VAGO et CROISSANT, 1964).

Les virions sont de forme ovoïde et mesurent en moyenne 2.500 Å de large et 4.000 Å de long. Trois constituants majeurs participent à leur architecture :

- une enveloppe dont la surface bosselée donne aux particules l'aspect d'une mûre ;

- un nucléoïde unilatéralement concave délimité par une coque et renfermant une structure filamenteuse repliée sur elle-même ;
- un corps latéral logé dans la concavité du nucléoïde.

L'étude cytochimique à haute résolution a d'autre part révélé :

- la nature ADN du génome viral et sa localisation à l'intérieur du nucléoïde ;
- la nature protéinique des constituants du corps latéral et de la substance périnucléoïdale ;
- la présence à la surface des virions inclus dans les sphérules ainsi qu'à l'intérieur de leur nucléoïde de matériel prenant la coloration des glycoprotéines. Le renforcement de cette coloration au niveau du nucléoïde après traitement des coupes à la DNase pourrait s'expliquer par le démasquage de résidus désoxyribose qui prendraient la coloration.

Ainsi que nous le verrons au chapitre V, l'architecture de l'entomopoxvirus de *Melolontha*, dont nous avons souligné ci-dessus les caractéristiques essentielles, est semblable, à quelques détails de structure près, à celle des poxvirus de vertébrés.

B - Purification des virions

Nous avons réalisé la purification des virions à partir des deux sources de matériel infectieux : les cellules adipeuses contenant les virions libres et les sphérules renfermant les virions inclus.

1 - Purification des virions libres

Après différents essais plus ou moins fructueux, c'est la technique mise au point par JOKLIK (1962a) pour la purification des poxvirus de vertébrés à partir de membranes chorioallantoïques d'embryons de poulets qui nous a fourni, en la modifiant légèrement, les meilleurs résultats. Le

tissu adipeux de larves infectées depuis 2 à 3 mois est homogénéisé à basse température, en présence de tampon Tris-HCl 0,01 M à pH 9,0, dans un broyeur Sorvall, pendant 3 minutes, à raison de 5 ml de tampon par larve. Les broyats sont clarifiés à 750 g pendant 10 minutes dans une centrifugeuse Sorvall réfrigérée équipée d'un rotor horizontal HB-4. Les surnageants sont récupérés en prenant soin de retenir la couche de lipides en haut du tube et centrifugés dans le même rotor à 15.000 g pendant 30 minutes. Les culots qui contiennent les virions sont repris dans le tampon Tris à raison de 1 ml pour 10 ml de volume initial et remis en suspension à la pipette puis aux ultrasons (3 fois 10" à 20 Kc/s). La suspension est alors déposée au-dessus d'une solution de sucrose à 36 % (p/v) et centrifugée 80 minutes à 23.000 g dans le même rotor. De nombreux débris cellulaires restent à l'interface tampon-sucrose ainsi que dans la phase sucrose qui est opalescente. Les virions concentrés dans les culots sont resuspendus dans le tampon Tris. A l'examen au microscope électronique ces suspensions montrent de nombreux virions contaminés par des éléments en "flocons" ou en "rosettes". La dernière étape de la purification consiste à déposer ces suspensions au sommet d'un gradient continu de sucrose 20-40 % dans le tampon Tris 0,001 M, établi dans des tubes de 12 ml et de 7,5 cm de haut. Les gradients sont centrifugés à 23.000 g pendant 45 minutes. Les virions se concentrent dans une bande, située à environ 1 cm du fond, que l'on recueille à l'aide d'une aiguille introduite par le haut du tube et reliée à une pompe péristaltique par un tuyau souple. En plus de cette bande, on retrouve de nombreux virions agrégés au fond du tube. Ces culots repris dans le tampon et dispersés aux ultrasons sont soumis à une deuxième centrifugation en gradient de sucrose. Si nécessaire, une nouvelle centrifugation de même type est effectuée avec le matériel provenant des bandes. Les virions récupérés des gradients sont ensuite dilués dans le tampon et envoyés au culot par centrifugation à 23.000 g pendant 20 minutes. Les culots sont lavés dans le même tampon et remis en suspension à la pipette. Observées au microscope électronique après coloration négative, ces suspensions s'avèrent pratiquement exemptes de contaminants cellulaires. La majorité des particules est de type mûriforme mais on observe également des particules pénétrées par l'acide phosphotungstique.

Nous avons essayé d'utiliser le fréon comme le préconise JOKLIK dans sa technique. Pour cela on ajoute à 4 volumes de broyat de tissu

adipeux 1 volume de fréon 113 et on broye 3 minutes de plus. Après clarification, la phase supérieure aqueuse est à nouveau extraite au fréon dans les mêmes conditions et clarifiée. Nous n'avons plus retrouvé de virions dans les culots de centrifugation de la phase aqueuse et cette opération a donc été supprimée.

2 - *Purification des virions contenus dans les sphérules*

Cette technique consiste à extraite les virions inclus dans les sphérules, la première étape est donc la dissolution de la protéine des corps d'inclusion.

Dans la section II E de ce chapitre, nous avons vu que les sphérules, contrairement aux autres corps d'inclusion de virus d'insectes (polyèdres et granules), ne sont pas solubles dans des solutions de carbonate de sodium et que seule l'adjonction à des solutions alcalines de composés réducteurs permettait de les dissoudre. Nous utilisons couramment pour cette dissolution une solution tampon thioglycolate-bicarbonate 0,125 M que nous préparons de la façon suivante : 1,438 g d'une solution à 80 % d'acide thioglycolique (MERCK) légèrement dilué dans l'eau distillée est amené à pH alcalin (pH 8-9) par addition de soude 2 N. On verse alors dans la solution le bicarbonate (1,05 gr.) préalablement solubilisé dans l'eau distillée et le mélange est amené au pH désiré (entre pH 10 et 11) par addition de soude normale. Le volume est ensuite ajusté à 100 ml dans une fiole jaugée et le pH de la solution finale est contrôlé. Le tampon est conservé congelé à -10°C. Les sphérules (1 à 5 mg/ml) sont maintenues en suspension dans le tampon par agitation à l'aide d'un barreau aimanté. Pour faciliter leur dispersion et assurer ainsi une dissolution homogène, les sphérules sèches sont préalablement imbibées par quelques gouttes d'eau et les grumeaux écrasés avec une baguette de verre. Leur dissolution est contrôlée par prélèvements d'échantillons que l'on observe au microscope en fond clair ou en contraste de phase.

La dissolution des sphérules observée en contraste de phase (Pl. XXIII, Fig. 72-77) commence par un craquellement des sphérules dans leur partie externe, rapidement suivi d'un gonflement avec perte de réfringence et de l'apparition de nombreuses granulations dans la zone centrale. Leur contenu

se dissout en faisant apparaître des particules punctiformes d'abord immobiles puis animées de mouvements browniens intenses. Ces particules sont les virions eux-mêmes que l'on peut voir au microscope photonique grâce à leur grande taille. Enfin, les sphérules éclatent en déversant leur contenu dans le milieu extérieur.

A ce stade, les suspensions sont centrifugées à 1.500 g pendant 10 minutes pour éliminer les sphérules incomplètement dissoutes. Les surnageants sont ensuite centrifugés à 20.000 g pendant 15-30 minutes et les culots contenant les virions sont repris dans l'eau distillée ou le tampon glycine-soude 0,1 M à pH 8,9. Après lavage dans l'eau distillée ou le tampon et clarification, la pureté des suspensions est contrôlée au microscope électronique.

Les suspensions destinées aux analyses biochimiques sont purifiées par centrifugation en gradient de densité de sucrose 40-60 % (p/p) pendant 2 heures à 23.000 g dans le tampon Tris-HCl 0,001 M pH 8,6. Les bandes correspondant aux virus, récupérées par pipetage, sont dialysées contre le tampon Tris.

3 - *Critique des techniques de purification*

Les deux techniques de purification décrites ci-dessus nous ont permis d'obtenir des suspensions de virions que l'on peut considérer comme pratiquement exemptes de contaminants cellulaires. Toutefois, elles ne permettent pas de séparer complètement les virions intacts de ceux partiellement dégradés et que l'on retrouve en faible quantité dans les bandes obtenues par centrifugation en gradients de sucrose. En outre, seule la deuxième nous a fourni des virions en quantité suffisante pour l'analyse biochimique.

La purification des virions libres est en effet d'un rendement très faible et variable. Cette irrégularité du rendement tient vraisemblablement au fort asynchronisme de la multiplication virale d'une cellule à l'autre dans le tissu adipeux (voir section IV A de ce chapitre) et au fait que les virions sont incorporés dans les sphérules au fur et à mesure de leur maturation. Des essais seraient nécessaires pour déterminer au bout de combien

de jours après l'infection il faut broyer les larves pour obtenir le rendement le plus élevé en virions libres. Enfin, un certain pourcentage de virions est perdu au cours des étapes de purification. Comme le souligne JOKLIK dans son travail cité plus haut, ces pertes proviennent en grande partie de l'agrégation des particules qui sont entraînées avec les débris cellulaires. Il préconise, pour éviter cette agrégation, l'utilisation de tampons de très faible force ionique. Il semble que, dans le cas de l'entomopox de *Melolontha*, cette agrégation persiste même dans ces conditions et leur dispersion aux ultrasons est délicate, car un traitement même modéré entraîne la destruction d'un grand nombre d'entre eux. Cette méthode de purification présente, par contre, sur la deuxième, l'avantage de ne pas mettre les virions en contact avec des solutions alcalines qui les dégradent. Lorsque son rendement sera meilleur elle sera précieuse pour la purification de virions en vue de leur analyse biochimique et de l'étude de leur équipement enzymatique (voir chapitres III et V).

L'obtention de virions à partir des sphérules pose des problèmes de délai de production dus à la lenteur d'évolution de la maladie, mais le rendement des extractions est nettement supérieur. La matière première étant déjà très propre (mélange d'inclusions ou sphérules purifiées), les suspensions virales sont exemptes de toute contamination cellulaire dès le départ. Par contre, la dissolution des sphérules pose un certain nombre de problèmes. Le temps nécessaire à la dissolution de la plupart des sphérules en suspension n'est en effet jamais rigoureusement le même d'un essai à l'autre. Il varie en particulier en fonction de la température (les dissolutions sont faites à température ambiante) de la concentration en sphérules, de l'âge et du pH du tampon. Même en s'efforçant de maintenir ces paramètres dans des limites assez strictes, on peut dire que la dissolution des sphérules n'a jamais lieu deux fois de suite exactement de la même façon. Or, un contact trop prolongé des virions avec le tampon thioglycolate aboutit à la dégradation de la plupart d'entre eux. Il est donc essentiel de suivre de très près la dissolution des sphérules au microscope, d'apprécier le moment où l'on doit l'arrêter et d'effectuer les premières centrifugations le plus vite possible. Pour cette raison, la clarification à 1.500 g précédant l'envoi au culot des virions est souvent omise et les suspensions sont directement centrifugées à 20.000 g pendant 20 minutes.

C - Caractérisation des suspensions virales purifiées

1 - *Spectre d'absorption dans l'ultra-violet*

Le spectre d'absorption dans le proche ultra-violet d'une suspension de virions dans le tampon Tris 10^{-3} M à pH 8,6 se caractérise par un léger épaulement entre 280 et 260 nm, sans maximum ni minimum distincts (Pl. XXIV, Fig. 78). L'allure de ce spectre s'explique par la grande taille des particules en suspension qui diffractent la quasi totalité de la lumière qui les traverse. L'absorption spécifique dans cette région du spectre, due à l'acide nucléique et aux protéines virales, est de ce fait masquée par cette diffraction. L'importance de cette dernière peut être estimée quantitativement par la méthode de BONHOEFFER et SCHACHMAN (1960) utilisée par JOKLIK (1962a) pour les suspensions de plusieurs poxvirus de vertébrés. La méthode consiste à réaliser le spectre d'absorption de la suspension en lumière visible, entre 600 nm et 300 nm. A ces longueurs d'onde l'absorption des protéines et des acides nucléiques étant nulle, les densités optiques mesurées correspondent donc à la diffraction de la lumière par les particules. On porte ces valeurs sur un papier à échelle doublement logarithmique et la droite ainsi obtenue est extrapollée jusqu'à 230 nm. On obtient ainsi les valeurs théoriques des absorptions dues à la diffraction dans l'UV et par différence avec les valeurs mesurées, celles dues à l'absorption spécifique des virions. On peut alors tracer le spectre d'absorption corrigé des virions. La courbe obtenue (Pl. XXIV, Fig. 79) présente un maximum à 275 nm. Le rapport 260/280 est de 0,95. La diffraction de la lumière par les particules en suspension est responsable de 87 % de l'absorption mesurée à 260 nm.

2 - *Dosage de l'acide nucléique et des protéines des virions*

Dans un premier temps, nous avons déterminé la nature de l'acide nucléique après hydrolyse des virions dans l'acide perchlorique 0,5 N à 90°C, pendant 20 minutes. La recherche de l'ADN a été effectuée par le réactif à la diphénylamine selon la technique de DISCHE (1930) modifiée par GILES et MYERS (1965) et celle de l'ARN par le réactif à l'orcinol selon la technique de MEJBAUM (1939). Sur trois analyses de ce type, les tests à la diphénylamine ont été positifs dans les trois cas, alors qu'aucune coloration ne

s'est développée avec le réactif à l'orcinol. Ces résultats indiquent que l'acide nucléique du virus est un ADN.

L'absence de réaction positive à l'orcinol qui forme cependant un complexe coloré avec le désoxyribose lorsque celui-ci est en quantité suffisante (DISCHE, 1930) semblait indiquer que la teneur en ADN des virions était faible.

Les dosages de l'ADN et des protéines ont été effectués sur deux préparations de virus obtenues par dissolution des sphérules (voir section III B de ce chapitre). Après analyse au spectrophotomètre, des fractions aliquotes de ces préparations ont été hydrolysées environ 1 heure dans la soude normale à la température du laboratoire pour les dosages de protéines et 30 minutes à 70°C dans l'acide perchlorique 0,5 N pour les dosages d'ADN. Les solutions étalons ayant servi à établir les courbes de références ont subi ces mêmes traitements. Les résultats de ces analyses figurent dans le tableau VII.

Tableau VII

TENEUR EN PROTEINES ET EN ADN DES VIRIONS DE L'ENTOMOPOXVIRUS DE *Melolontha* PURIFIES PAR DISSOLUTION DES SPHERULES

Préparation	UDO_{260} (1)	ADN		Protéines		% ADN
		µg/ml	$\mu g/UDO_{260}$	µg/ml	$\mu g/UDO_{260}$	
1	1,0	1,68	1,68	73,6	73,6	2,23
2	0,67	1,09	1,64	48,0	71,2	2,19
Moyenne			1,66		72,4	2,21

(1) définie comme la quantité de matériel ayant une densité optique de 1 à 260 nm dans une cuve de 1 cm de trajet optique.

La teneur moyenne en ADN et en protéines de ces préparations était respectivement de 1,66 µg et 72,4 µg par unité de densité optique à

260 nm (UDO_{260}). Cette unité a été définie par JOKLIK (1962a) pour les poxvirus de vertébrés comme la quantité de matériel viral qui, mesurée dans une cuve de 1 cm de trajet optique, a une densité optique de 1 à 260 nm. Le pourcentage moyen d'ADN dans les virions calculé d'après le poids total d'ADN + protéine est de 2,21 (tableau VII).

3 - *Essais de virulence des virions purifiés à partir des sphérules*

Bien que l'observation au microscope électronique des virions purifiés à partir des sphérules montre que plus de 90 % d'entre eux sont apparemment intacts, il était cependant nécessaire de vérifier que leur pouvoir infectieux était conservé, tout au moins en partie. Dans un premier temps, nous avons vérifié que les suspensions purifiées non diluées étaient toujours pathogènes (voir tableau VIII). Ces suspensions ont été inoculées à des larves L_3.

Tableau VIII

POUVOIR PATHOGENE DES SUSPENSIONS VIRALES NON DILUEES PURIFIEES PAR DISSOLUTION DES SPHERULES

N° de l'essai	Nombre de larves	UDO_{260}/ml (1) des suspensions	Mortalité (2)	Larves Virosées (3)
1	16	0,32	2	16
Témoin	10		0	0
2	18	0,82	4	18
Témoin	10		1	0
3	18	0,40	4	15
Témoin	10		1	0
4	20	0,35	0	20
Témoin	10		0	0

(1) définie comme la quantité de matériel viral ayant une densité optique de 1 à 260 nm dans une cuve de 1 cm de trajet optique.
(2) Larves trouvées mortes au cours des contrôles.
(3) Nombre total de larves infectées au bout de 2 mois.

La concentration en virions de ces suspensions n'était pas connue mais il est possible d'en avoir une estimation approchée par comparaison avec les données publiées pour les suspensions de poxvirus de vertébrés. On peut en effet admettre, en première approximation, que la valeur de $1,2 \times 10^{10}$ particules par UDO_{260} déterminée avec précision pour les suspensions purifiées de poxvirus de vertébrés (JOKLIK, 1962a) est également valable pour celles d'entomopoxvirus. S'il en est ainsi, les suspensions utilisées dans nos essais préliminaires contenaient entre $0,4 \times 10^{10}$ et 1×10^{10} particules par ml approximativement, soit environ 10^9 particules par inoculum (0,1 ml). Même en supposant une forte perte du titre infectieux des suspensions au cours de la purification, chaque inoculum devait contenir un nombre élevé de virions infectieux et les résultats obtenus au tableau VIII sont ceux auxquels on devait s'attendre.

Nous avons voulu vérifier si cette estimation du nombre de virions dans les suspensions était valable et pour cela nous avons effectué une série d'inoculations avec des dilutions d'une même préparation. La suspension de départ, titrant 1 UDO_{260}/ml, a été diluée de 10 fois en 10 fois jusqu'à la dilution 10^{10}. Des lots de 10 larves ont été inoculés avec ces dilutions, en partant de la dilution 10^3. Les résultats de cette expérience portés dans le tableau IX montrent qu'à l'exception de quelques cas de mortalité précoce dus à des facteurs non viraux toutes les larves étaient infectées au bout de 2 mois, quelle que soit la dilution.

Tableau IX

POUVOIR PATHOGENE D'UNE SUSPENSION VIRALE PURIFIEE PAR DISSOLUTION DES SPHERULES : INFLUENCE DE LA DILUTION (1)

	Dilutions							
	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8	10^9	10^{10}
Nombre de larves	10	10	10	10	10	10	10	10
Mortalité (2)	1	1	2	0	1	0	1	0
Larves virosées (3)	9	9	8	10	9	10	9	10

(1) La solution mère titrait I UDO_{260}/ml.
(2) Larves trouvées mortes au cours des contrôles.
(3) Nombre total de larves infectées au bout de 2 mois.

Or, à la dilution la plus forte, la concentration en virions était théoriquement de 0,12 particule/inoculum, c'est-à-dire que seul, un faible pourcentage de larves aurait dû être infecté. En fait, chaque inoculum contenait au moins une particule infectieuse et il faut donc admettre que la correspondance entre UDO_{260} et nombre de particules établie pour les poxvirus de vertébrés ne peut s'appliquer exactement aux suspensions d'entomopoxvirus. La faible teneur en ADN des virions entraînant une absorption plus faible des suspensions à 260 nm, est peut-être responsable de la sous-estimation observée du nombre de virions. Ces résultats doivent être confirmés par de nouveaux essais, en particulier en poussant plus loin les dilutions et en dénombrant les particules au microscope électronique comme l'a fait JOKILK (1962a). Quoiqu'il en soit, ces résultats permettent d'affirmer, dès à présent, que les virions purifiés par dissolution des sphérules sont pour la plus grande part encore infectieux.

4 - *Discussion*

L'analyse spectrophotométrique des virions de l'entomopoxvirus de *Melolontha* a mis en évidence la ressemblance de leur spectre d'absorption dans l'ultra-violet avec celui du poxvirus de vertébrés (JOKLIK, 1962a). Il s'agit, dans l'un et l'autre cas, de virions de grande taille qui se comportent comme des particules en suspension et non comme des solutions de nucléoprotéines. Il s'en suit une importante diffraction de la lumière qui représente l'essentiel de l'absorption mesurée (87 % à 260 nm pour l'entomopoxvirus contre 90 % pour les poxvirus de vertébrés).

L'identification biochimique du génome viral à un ADN confirme les résultats de la cytochimie et apporte une preuve supplémentaire de la parenté de ce virus avec les poxvirus de vertébrés. Les résultats des dosages d'ADN et de protéines dans les virions font apparaître des différences quantitatives par rapport aux poxvirus de vertébrés. Ainsi, la teneur en protéines de l'entomopoxvirus est légèrement plus forte que celle des poxvirus de vertébrés (72,4 µg/UDO_{260} contre 64 µg/UDO_{260} pour le cowpox) et le pourcentage d'ADN est beaucoup plus faible (2,2 % contre 5 % pour les poxvirus de vertébrés). Cette dernière différence reflète peut-être une caractéristique propre aux entomopoxvirus puisqu'un pourcentage d'ADN encore plus faible

(1,38 %) a été mesuré chez l'entomopoxvirus d'*Amsacta* (voir chapitre III). Il n'est toutefois pas exclu que ces différences proviennent de la technique de purification de ces virus. Il est possible, en effet, que le rapport ADN/ protéines de ces virions soit faussé par la présence dans les suspensions de virions plus ou moins dégradés qui ont pu perdre tout ou une partie de leur acide nucléique. C'est pourquoi nous pensons que ces résultats doivent être confirmés par des analyses de virions purifiés à partir de broyats d'insectes (virions libres). En plus des protéines et de l'ADN, il est vraisemblable que les virions contiennent également une fraction lipidique et une fraction glycoprotéinique qui sont des constituants structuraux des poxvirus de vertébrés (voir chapitre V). La réaction positive des virions à la coloration des glycoprotéines selon la technique de RAMBOURG (voir Pl. XXII, Fig. 68) est en faveur de cette hypothèse.

Le contrôle de virulence des virions isolés à partir des sphérules soulève le problème du titrage biologique des suspensions virales. Deux méthodes de titrage étaient envisageables : la méthode des plages obtenues par l'infection de cellules cultivées *in vitro* et la méthode de la dose léthale 50 % utilisant des larves. Dans l'impossibilité où nous sommes actuellement de multiplier le virus sur cultures cellulaires seule la deuxième méthode restait possible. Toutefois, étant donné les caractéristiques du matériel vivant sur lequel nous avons travaillé, nous n'avons pas cherché à développer cette méthode. La durée du cycle biologique du hanneton (3 ans, voir Fig. 1), l'impossibilité de réaliser de façon courante son élevage complet en laboratoire, les difficultés de se procurer en quantité suffisante des larves à un stade physiologique homogène et les délais importants imposés par la lenteur d'évolution de la maladie, surtout aux doses faibles (ROBERT, 1967) sont autant d'obstacles ne permettant pas d'envisager sérieusement la mise au point d'un tel titrage.

IV - ETUDE ULTRASTRUCTURALE DU CYCLE DE MULTIPLICATION VIRALE DANS LES CELLULES DU TISSU ADIPEUX

A - Essais de multiplication du virus sur culture de cellules *in vitro*

La culture *in vitro* de cellules de vertébrés est l'une des

techniques les plus couramment utilisées en virologie. Elle permet d'obtenir des cellules en couches monocellulaires à un même stade physiologique et de les infecter de façon synchrone. Elle a été largement exploitée pour l'étude ultrastructurale et biochimique des étapes de la multiplication des virus de vertébrés, en particulier des poxvirus (voir chapitre V).

Malgré de nombreux efforts et quelques succès, la culture *in vitro* de cellules d'invertébrés n'est pas encore couramment utilisée comme technique de routine pour des études virologiques (VAGO, 1972). Cela tient, entre autres, aux difficultés rencontrées dans l'établissement et le maintien de lignées cellulaires continues.

L'infection de cellules cultivées *in vitro* nous est également apparue comme la meilleure voie pour aborder l'analyse chronologique précise des étapes de la multiplication de l'entomopoxvirus de *Melolontha*. Dans ce but, nous avons tenté d'obtenir le développement de ce virus en culture cellulaire d'invertébrés et de vertébrés (*). Ces essais, dans le détail desquels nous n'entrerons pas, ont consisté à infecter des cultures et à les fixer pour la microscopie électronique après un temps donné d'infection.

Les essais d'infection de cultures primaires obtenues à partir du vaisseau dorsal de l'hôte (VAGO et al., 1968 ; VAGO et QUIOT, 1969 ; QUIOT, 1971) n'ont pas été suivis de multiplication virale. Nous voyons deux explications possibles à cet échec : d'une part, l'hétérogénéité du stade physiologique des larves utilisées entraîne une irrégularité dans l'établissement des cultures ; d'autre part, les difficultés techniques d'obtention de ces cultures qui nécessitent un nombre important de larves ne nous ont pas permis d'effectuer de nombreux essais. Ces résultats négatifs ne peuvent donc être considérés comme définitifs.

Nous avons également essayé d'infecter des cultures d'une lignée cellulaire provenant de vaisseau dorsal du Dictyoptère *Leucophaea maderae* (VAGO et QUIOT, 1969 ; QUIOT, 1971). L'infection de cette lignée

---

(*) Ce travail a été réalisé en collaboration avec J.M. QUIOT, de notre Laboratoire.

se traduit par l'apparition, dans les fioles de culture, de figures de dégénérescence cellulaire visibles au microscope photonique en contraste de phase. En microscopie électronique, on retrouve sur coupes fines de cellules de nombreux virions phagocytés intacts ou dégradés. Toutefois, on ne reconnaît pas de foyers de réplication de l'ADN (viroplasmes) ni de formes virales immatures. La dégénérescence observée n'est donc apparemment pas due à la multiplication virale.

Enfin, nous avons tenté des infections de cultures de cellules de vertébrés, maintenues à la température de 28°C, compatible avec la multiplication du virus *in vivo*. Qu'il s'agisse de cellules KB ou BHK 21, nous n'avons jamais obtenu que des résultats négatifs.

B - Conditions d'étude du cycle dans les cellules du tissu adipeux *in vivo*

Cette étude s'est heurtée à des difficultés inhérentes à la lenteur d'évolution de la maladie et à la nature du tissu étudié. On sait, en effet, que les larves au troisième stade maintenues à la température de 20°C ne meurent qu'au bout de 4 à 8 mois, même après inoculation avec de très fortes doses de virus (ROBERT, 1967). On a, d'autre part, constaté un fort asynchronisme du développement viral dans le tissu adipeux se traduisant sur coupes histologiques de larves fixées pendant les deux premiers mois suivant l'infection, par la présence dans certaines cellules d'un même lobe de fuseaux et de sphérules alors que les cellules voisines ne présentent pas de lésion apparente (AMARGIER et al., 1964). La recherche en microscopie électronique des tout premiers foyers de multiplication virale suivant l'infection nécessiterait l'exploration exhaustive de ce tissu chez plusieurs larves, ce qui est impensable étant donné sa masse importante (environ 50 % du poids frais d'une larve L_3). Pour tourner en partie ces difficultés, nous avons examiné des larves infectées depuis environ 2 mois. A ce stade relativement avancé de l'infection, toutes les cellules contenaient des particules virales à différents stades de leur développement. Il n'a pas été possible de ce fait d'analyser la chronologie réelle des étapes du cycle de multiplication virale. Nous avons cependant pu reconstituer la séquence de certaines

de ces étapes en nous appuyant sur l'étude de nombreuses cellules et en nous référant aux travaux effectués chez les poxvirus (voir chapitre V).

C - Morphogénèse virale

La morphogénèse virale a lieu dans des aires cytoplasmiques généralement proches du noyau, en étroite association avec des masses de substance à aspect granulaire dense aux électrons, appelées viroplasmes (Pl. XXV, Fig. 80). C'est au sein de ces aires que l'on observe les premières ébauches de virions sous la forme d'enveloppes sphériques incomplètes (particules de type 1). Ces enveloppes apparaissent généralement au contact direct des plages viroplasmiques qu'elles encerclent. En se refermant sur elles-mêmes, ces cupules délimitent des particules sphériques dont le diamètre moyen se situe entre 450 et 500 nm (particules de type 3). L'enveloppe de ces particules est constituée de deux membranes, chacune d'environ 75 Å d'épaisseur (Pl. XXVI, Fig. 82). La structure trilamellaire de la membrane interne est typique d'une membrane unitaire, tandis que celle de la membrane externe ne peut être résolue.

L'élaboration d'enveloppes virales peut se produire également sans qu'il y ait contact direct avec les masses de viroplasme. On trouve en effet fréquemment, au sein de plages cytoplasmiques ayant une faible opacité aux électrons, des formes en cupules et des particules sphériques claires aux électrons (particules de type 2, Pl. XXV, Fig. 81 ; Pl. XXVII, Fig. 86). Ces formes semblent évoluer en particules denses par condensation de matériel à l'intérieur de l'enveloppe ou plus vraisemblablement par remplissage avec du matériel externe pénétrant par des ouvertures dans la sphère. Les particules claires sont particulièrement abondantes dans les cellules fortement atteintes qui montrent par ailleurs de nombreux signes de dégénérescence (voir section V de ce chapitre). On observe fréquemment, à l'intérieur de ces particules, des éléments vésiculaires de 400-600 Å de diamètre limités par une membrane unitaire d'environ 75 Å d'épaisseur plus ou moins refermée sur elle-même (Pl. XXVI, Fig. 83). De telles vésicules sont également abondantes dans le cytoplasme environnant et certaines d'entre elles s'observent en continuité avec la membrane interne des cupules, suggérant leur participation dans l'élaboration de l'enveloppe virale.

L'évolution des particules sphériques à forte opacité aux électrons (type 3) en virions mûrs se produit par une série de différenciations à l'intérieur de l'enveloppe dont certaines étapes, probablement fugaces, sont difficiles à saisir. On note dans certaines particules un noyau de densification, généralement excentrique, parfois en lunule, à partir duquel le nucléoïde semble s'organiser (particules de type 4, Pl. XXV, Fig. 81 ; Pl. XXVII, Fig. 89). Dans quelques rares cas nous avons observé l'ébauche du nucléoïde dans des particules sphériques (Pl. XXV, Fig. 81 ; Pl. XXVII, Fig. 90). Parallèlement à la différenciation du nucléoïde, la particule s'allonge par compression latérale. C'est ainsi que l'on reconnaît à la périphérie des aires de morphogénèse et réparties dans tout le cytoplasme des particules de forme ovale possédant un nucléoïde bien développé mais dont l'espace entre le nucléoïde et l'enveloppe est soit vide, soit partiellement rempli d'une substance dense (particules de type 5, Pl. XXVII, Fig. 91). Par condensation du matériel entourant le nucléoïde et différenciation du corps latéral, ces formes évoluent en virions mûrs (particules de type 6) dont nous avons décrit la structure précédemment.

D - Structures associées aux aires de virogénèse

En plus des formes de maturation et des viroplasmes, on note dans les aires de virogénèse deux types de structures. Les premières sont des amas de substance ayant une opacité moyenne aux électrons et possédant une structure organisée (Pl. XXVI, Fig. 84) ; Pl. XXVI, Fig. 85). A fort grossissement, ils apparaissent constitués par l'accumulation de bâtonnets cylindriques de 150 Å de diamètre environ, qui seraient en fait des cylindres creux ainsi que le suggère l'observation de profils circulaires de même diamètre au sein de ces plages. Le deuxième type est constitué par des faisceaux de lamelles de plusieurs microns de long et d'épaisseur variable présentant à fort grandissement une structure en chevrons (Pl. XXVIII, Fig. 92 et 93).

E - Dissémination des virions

La dissémination des virions synthétisés dans les cellules

adipeuses est réalisée par deux processus dont la signification et l'importance relative sont différentes.

1 - *Expulsion des virions libres*

On observe à la périphérie des cellules adipeuses des virions enveloppés, individuellement ou plus généralement en groupe, dans une membrane supplémentaire qui semble provenir du réticulum endoplasmique (Pl. XXVIII, Fig. 94 ; Pl. XXIX, Fig. 97). Cette membrane porte parfois sur sa face externe de petits spicules (Pl. XXVIII, Fig. 95 et 96). On retrouve dans les espaces intercellulaires des virions semblables qui ont été expulsés par passage à travers la membrane cellulaire (Pl. XXIX, Fig. 97 à 100). Au cours de ce processus d'expulsion, les virions semblent acquérir une enveloppe supplémentaire ayant pour origine la membrane cellulaire. L'enveloppe de ces virions est en effet fortement contrastée par le rouge de ruthénium qui colore également de façon intense le feuillet externe de la membrane cellulaire (Pl. XXIX, Fig. 98 et 99).

2 - *Inclusion des virions dans les sphérules*

L'expulsion des virions libres dans les espaces intercellulaires du tissu adipeux n'intéresse qu'une fraction apparemment faible des virions. La plupart d'entre eux sont en effet incorporés au cours de la pathogénèse dans un réseau cristallin protéinique qui formera la sphérule (Pl. XXX, Fig. 101 ; Pl. XXXI, Fig. 102). Ces inclusions au nombre d'une ou plus rarement de deux par cellule se développent dans des aires cytoplasmiques généralement éloignées des aires virogènes. Certaines de petite taille (3 à 4 µm) ne contiennent qu'un petit nombre de virions inclus. Leur contour est irrégulier, présentant des dépressions dans lesquelles sont logés des virions, leur grand axe orienté radialement. Tout autour des sphérules en voie de formation on note une concentration en virions beaucoup plus importante que dans le reste du cytoplasme. Par cristallisation progressive de protéine et incorporation des virions (Pl. XXXII, Fig. 104), les sphérules s'accroissent et leur taille atteint 15 à 20 microns de diamètre. A partir d'un certain développement des sphérules, les virions ne sont plus incorporés mais la protéine du cristal continuant à être synthétisée, il se forme une couche périphé-

rique que nous avons appelée "cortex" (Pl. VII, Fig. 25). Ces sphérules sont qualifiées de "mûres" par opposition à celles qui incluent encore des virions.

Au cours de leur inclusion dans les sphérules, les virions subissent certaines modifications intéressant le nucléoïde et l'enveloppe. Le contenu du nucléoïde qui possède une structure fibreuse dans les virions libres ou inclus à la périphérie des sphérules en voie de développement devient plus dense dans les virions situés plus profondément (Pl. XXXII, Fig. 105). On y distingue, en outre, la structure filamenteuse que nous n'avons pas observée sur les coupes de virions libres. Le contour de ces virions est d'autre part plus nettement délimité et les ornementations à la surface de l'enveloppe se reconnaissent mieux. La zone claire aux électrons formant un hâlo entre l'enveloppe de la particule et la protéine cristalline de l'inclusion apparaît progressivement.

Enfin, il est intéressant de noter que seuls les virions inclus profondément prennent la coloration des glycoprotéines selon la technique de RAMBOURG (1967) alors que les virions libres ou en voie d'inclusion ne sont pas colorés par cette technique (Pl. XXXI, Fig. 103). Il semble donc que ces modifications de structure s'accompagnent de modifications dans la composition chimique des virions après leur inclusion. Il est toutefois difficile dans ces observations de faire la part des artéfacts et des véritables modifications. Ces images peuvent en effet résulter de la pénétration plus ou moins bonne des fixateurs dans les sphérules. On sait d'autre part que, si la surface bosselée des virions libres n'est pas nettement visible sur les coupes ultra-fines de particules (Pl. XIX, Fig. 58), elle se reconnaît parfaitement sur les virions purifiés et observés en contraste négatif (Pl. XVI, Fig. 44). Enfin, l'hypothèse de certaines contraintes physiques que la trame cristalline exercerait sur les virions ne peut être écartée.

La synthèse de matériel viral et la virogénèse se poursuivent jusqu'à un stade avancé de la maladie. C'est ainsi que l'on peut observer simultanément dans des cellules fortement atteintes des particules immatures à côté des formes mûres et de sphérules complètement développées. Plusieurs vagues successives de virions sont ainsi produites et incluses au fur et à mesure dans les sphérules.

F - Discussion

Le cycle de multiplication de l'entomopoxvirus de *Melolontha* tel que nous l'avons observé dans les cellules adipeuses de son hôte apparaît fort complexe et présente de nombreuses analogies avec celui des poxvirus de vertébrés (voir chapitre V). Les étapes du cycle de multiplication de ces virus ont été analysées avec une grande précision dans leur chronologie en utilisant des cultures cellulaires infectées de façon synchrone. En l'absence de système *in vitro* comparable et à cause du fort asynchronisme du développement viral dans le système cellulaire que nous avons étudié, une analyse aussi précise n'a pu être réalisée avec l'entomopoxvirus de *Melolontha*. C'est ainsi, en particulier, que les premières étapes du cycle, telles que la pénétration des particules infectantes, la dénudation du nucléoïde et la libération de l'ADN viral n'ont pu être observées dans les cellules adipeuses. Par contre, ces étapes initiales ont été reconnues lors de l'étude du développement viral dans les cellules sanguines qui se sont avérées être un matériel mieux adapté à cette étude (DEVAUCHELLE et al., 1971 ; DEVAUCHELLE, 1972) (*). Il y a donc lieu de penser que ces premières étapes du cycle se déroulent selon un schéma semblable dans les cellules adipeuses.

L'observation de formes immatures présentant divers degrés d'organisation nous a permis de reconstituer la séquence des principales étapes de la morphogénèse virale. Dans des aires cytoplasmiques proches du noyau apparaissent au contact direct de masses denses aux électrons appelées viroplasmes, des enveloppes virales en forme de cupule (type 1). En se refermant sur elles-mêmes, ces enveloppes encerclent une portion du viroplasme et donnent naissance à des particules sphériques denses aux électrons (type 3). Ces formes semblent pouvoir se développer également sans contact direct avec les viroplasmes et passeraient alors par un stade intermédiaire de particules sphériques claires (type 2). Autour d'un noyau de condensation apparaissant au sein de la substance dense des particules de type 3 se différencient les constituants du nucléoïde (type 4). Enfin, la particule

---

(*) Le cycle de la réplication du virus dans les hymocytes de *Melolontha* faisant l'objet d'un chapitre dans la thèse de Gérard DEVAUCHELLE (1972) ne sera pas exposé ici.

s'allonge et par condensation de matériel entre l'enveloppe et le nucléoïde se transforme en particule mûre (types 5 et 6). Ainsi que nous l'avons mentionné plus haut, ce schéma logique mais hypothétique repose essentiellement sur l'observation de particules de complexité croissante et sur les ressemblances étroites qu'elles présentent avec les formes immatures des poxvirus de vertébrés. L'obtention de culture *in vitro* de cellules de *Melolontha* permettra sans doute de confirmer et éventuellement de modifier ce schéma.

Deux modes de dissémination des virions synthétisés dans les cellules adipeuses ont été reconnus. Le premier, qui est le rejet des virions dans les espaces intercellulaires, intervient, selon toute vraisemblance, dans la propagation de l'infection à l'échelle tissulaire. Le deuxième, qui consiste en l'incorporation des virions dans un réseau cristallin protéinique aboutissant à la formation des sphérules a, par contre, une signification écologique importante. Par le grand nombre de virions qu'elles renferment et leurs propriétés physico-chimiques remarquables, ces inclusions assurent une dissémination efficace du virus dans la nature. A la mort de l'insecte, les sphérules sont libérées dans le sol et les virions qu'elles renferment conservent leur virulence pendant plusieurs mois et peuvent ainsi infecter les larves de hanneton de la génération suivante (ROBERT, 1967). C'est par ce processus de dissémination que le virus se maintient depuis plusieurs années dans son biotope d'origine et qu'il a été possible de créer expérimentalement des foyers d'infection dans les populations naturelles de vers blancs (HURPIN et ROBERT, 1969).

V - LES ALTERATIONS DES CELLULES DU TISSU ADIPEUX AU COURS DE L'INFECTION VIRALE

La multiplication de l'entomopoxvirus de *Melolontha* dans le tissu adipeux de son hôte entraîne de profondes perturbations dans le métabolisme des cellules infectées qui se traduisent par d'importantes altérations des structures cellulaires normales. Nous avons étudié au microscope électronique ces structures dans des cellules saines et leurs altérations à différents stades d'infection des cellules. Nous avons fait appel, dans cette étude, à des techniques cytochimiques pour caractériser certains constituants.

C'est ainsi que nous avons recherché les polysaccharides par la technique au TCH-protéinate d'argent, selon SELIGMAN et al. (1965) modifiée par THIERRY (1967), les mucopolysaccharides acides par la technique au rouge de ruthénium, selon LUFT (1966), les glycoprotéines par la technique de RAMBOURG (1967) sur coupes en GMA.

A - Ultrastructure des cellules saines

Au troisième stade larvaire, le tissu adipeux de *Melolontha* est constitué de cellules de grande taille riches en enclaves cytoplasmiques de réserve facilement identifiables au microscope électronique. On distingue trois types principaux d'enclaves correspondant à l'accumulation de réserves glucidiques, protéiniques et lipidiques (Pl. XXXIII, Fig. 106).

Les premières sont constituées par des grains de glycogène se présentant sous forme de rosettes (glycogène α) de 1.000 Å de diamètre environ ou de grains de 100 à 200 Å (glycogène β). Les deux types de grains sont très abondants et répartis dans tout le cytoplasme.

Les enclaves de réserves protéiques forment des amas de grande taille (3 à 5 microns), le plus souvent ovales mais parfois aussi à contours anguleux, de forte opacité aux électrons. Leur structure n'est pas homogène et l'on reconnaît à l'intérieur d'une même inclusion des plages claires aux électrons à côté de plages de matériel plus condensé ayant souvent des contours géométriques.

Les lipides qui forment de larges plages sans structure constituent la troisième substance de réserve identifiable.

En dehors des enclaves de réserves que nous venons de décrire et qui occupent la presque totalité du cytoplasme, on trouve relativement peu d'organites cellulaires. Les mitochondries assez peu nombreuses et localisées essentiellement à la périphérie du noyau sont de forme allongée et leur matrice dense rend difficile l'observation des crêtes. Les ribosomes sont nombreux, libres ou en chaînettes, particulièrement autour des enclaves protéiniques. L'ergastoplasme est présent sous forme de lamelles concentri-

ques périnucléaires et de petites citernes réparties dans tout le cytoplasme. Les membranes plasmiques des cellules adjacentes sont étroitement accolées les unes aux autres, déterminant des contours cellulaires polygonaux.

Le noyau des cellules saines est de petite taille (5 à 7 µ) et ses contours légèrement ovales sont parfois repoussés par des enclaves lipidiques et protéiniques qui l'entourent (Pl. XXXIII, Fig. 107). Le nucléoplasme est peu dense aux électrons et des amas chromatiniens dispersés forment des taches irrégulières au sein de celui-ci. La double membrane est d'épaisseur régulière et entourée de rangées concentriques d'ergastoplasme.

B - Ultrastructure des cellules infectées

Les structures cellulaires décrites ci-dessus subissent de profonds remaniements au cours de la maladie tandis qu'apparaissent de nouvelles structures directement liées à la multiplication virale, tels les viroplasmes, les particules virales immatures et matures, les inclusions fusiformes et ovoïdes, etc., structures que nous avons décrites précédemment.

Le cytoplasme s'appauvrit progressivement en inclusions de réserves, les inclusions protéiniques étant les premières à disparaître. La proportion de grains de glycogène en rosette diminue nettement au cours de l'infection et devient nulle en fin d'évolution. Toutefois, on trouve toujours du glycogène dans le cytoplasme, mais uniquement sous forme de particules de petite taille (glycogène β), (Pl. XXXIV, Fig. 108 et 109). Celui-ci est particulièrement bien mis en évidence par la technique de coloration des polysaccharides selon THIERRY (1967). Les enclaves lipidiques se raréfient également mais elles ne disparaissent jamais complètement. Cet appauvrissement en enclaves de réserves conduit à un éclaircissement du cytoplasme dans lequel de nombreuses vacuoles et figures de dégénérescence myélinique apparaissent. Les mitochondries subissent des altérations caractérisées par le gonflement et l'éclaircissement de leur matrice.

Les membranes plasmiques des cellules adjacentes se détachent les unes des autres et, dans les espaces intercellulaires ainsi formés, on note de nombreux tubules de 550 Å de diamètre qui présentent à fort grandis-

sement une structure en hélice (Pl. XXXV, Fig. 110-113). Ces tubules sont fortement contrastés par le rouge de ruthénium et par l'acide phosphotungstique.

Le noyau est également le siège de profondes altérations (Pl. XXXVI, Fig. 114-117). Dès les premiers stades de l'infection, il apparaît dilaté et son contenu moins dense aux électrons. Dans les cellules fortement infectées, il peut atteindre 10 à 15 µm de diamètre et son opacité aux électrons est alors considérablement réduite. Les amas chromatiniens, de plus en plus rares, se localisent à la périphérie des noyaux et le nucléoplasme très clair n'est plus représenté que par de fins filaments et de petites granulations. La coloration spécifique des polysaccharides révèle la présence de glycogène dans le nucléoplasme dont la signification demeure obscure (Pl. XXXVI, Fig. 116). Il apparaît dans les noyaux fortement dégénérés des tubules comparables par leur structure à ceux décrits dans les espaces intercellulaires (Pl. XXXVI, Fig. 117). Parallèlement à ces modifications du nucléoplasme, on note une délamination de la double membrane nucléaire avec parfois accumulation du matériel dense dans les boursouflures ainsi formées (Pl. XII, Fig. 35-38). La paroi nucléaire finit par se rompre et le nucléoplasme se répand dans le cytoplasme.

A un stade ultime de dégénérescence cellulaire, la membrane plasmique se rompt, déversant le contenant des cellules dans le milieu intérieur. Cette lyse des cellules produit une dissociation du tissu adipeux dont certains lobes se détachent. Entraînés par le courant d'hémolymphe, ces fragments viennent s'accumuler dans la région pygidiale, entre la cuticule et l'ampoule rectale (Pl. II, Fig. 3).

C - Discussion

L'étude comparée, au microscope électronique, des cellules adipeuses saines et infectées de *Melolontha* a permis de mettre en évidence un certain nombre de modifications cellulaires au cours de la pathogénèse virale, que l'on peut classer dans les trois catégories suivantes :

- diminution progressive des substances de réserves ;

- altérations des structures cellulaires normales ;
- apparition de nouvelles structures directement liées à la synthèse virale.

Etudiant par des techniques histochimiques l'évolution du tissu adipeux au cours de la même infection, MORRIS (1966) a noté certaines de ces modifications, en particulier :

- une augmentation régulière du diamètre des noyaux avec margination de la chromatine, sans changement apparent de leur teneur en ADN ;
- une augmentation progressive de l'ARN cytoplasmique pendant les 75 premiers jours, suivie d'une légère diminution ;
- une augmentation de protéines cytoplasmiques tout au long de la maladie ;
- une diminution importante du glycogène visible dès la fin du premier mois.

Nous avons d'autre part effectué un certain nombre d'analyses biochimiques sur des échantillons de tissu adipeux prélevés sur des larves saines et à différents stades d'évolution de la maladie. Les résultats préliminaires de ces analyses, dans le détail desquelles nous n'entrerons pas, indiquent :

- une diminution importante de la teneur en glycogène chez les larves malades ;
- une augmentation régulière, tout au long de la maladie, de la teneur en ARN et ADN, alors que ces constituants restent sensiblement au même taux dans les larves saines ;
- une augmentation nettement plus importante de la teneur en protéines des larves infectées que des larves saines.

Il y a donc concordance entre les données de l'histochimie, de la cytochimie et de l'analyse biochimique.

Le métabolisme des cellules adipeuses de *Melolontha* semble essentiellement orienté au dernier stade larvaire vers la synthèse et l'accumulation de réserves : glycogène, lipides et protéines qui serviront au

moment de la métamorphose. Ces réserves se présentent, au microscope électronique, sous forme d'enclaves occupant la quasi totalité du cytoplasme. Un des effets les plus évidents de la multiplication virale dans ces cellules est la perturbation de ces synthèses au profit de celles des constituants viraux et des protéines de fuseaux et de sphérules. Ces désordres métaboliques se traduisent, entre autre, par la perte progressive des substances de réserves. Tout se passe donc somme si les synthèses virales se faisaient aux dépens de ces substances. Etant donné l'abondance de ces dernières, il apparaît que le virus peut se multiplier, les fuseaux et les sphérules se développer pendant plusieurs semaines sans entraîner la mort de l'insecte. C'est ainsi que nous avons pu observer à plusieurs reprises dans des cellules la présence simultanée de gros fuseaux et de sphérules matures à côté de petits fuseaux et de foyers de synthèse de matériel viral (viroplasmes). Toutefois, à partir d'un certain degré de dégénérescence cellulaire, les mécanismes de régulation des synthèses virales ne semblent plus pouvoir s'exercer, entraînant l'apparition de nombreuses formes immatures vides que nous avons décrites précédemment.

Des altérations cellulaires comparables à celles que nous avons observées ont été décrites dans de nombreux types de cellules infectées par des poxvirus de vertébrés (références dans JOKLIK, 1966, 1968a) ou d'autres virus (références dans DALES, 1965b). Elles sont généralement considérées comme peu spécifiques et certaines ont pu être reproduites expérimentalement par traitement des cellules avec des inhibiteurs du métabolisme ou des substances toxiques. Le fait que ces observations aient été faites sur des cellules de vertébrés, la plupart en cultures *in vitro*, rend toute comparaison avec nos observations difficile.

Des altérations des cellules adipeuses de *Melolontha* nous retiendrons, cependant, l'hypertrophie nucléaire avec perte d'opacité aux électrons du nucléoplasme et la présence de tubules dans les espaces intercellulaires. La première, ainsi que nous l'avons mentionné, se produit à un stade précoce de l'infection et s'accentue tout au long de la maladie. Elle suggère des interactions entre génome cellulaire et génome viral dont on ne peut définir la nature actuellement. De telles interactions ont été mises en évidence dans plusieurs types de cellules de vertébrés infectées avec différentes souches de poxvirus. En particulier, plusieurs auteurs ont montré que

la synthèse de l'ADN cellulaire était rapidement inhibée après l'infection (HANAFUSA, 1960 ; JOKLIK et BECKER, 1964 ; KATO et Coll., 1964 ; KIT et DUBBS, 1962 ; MAGEE et Coll., 1960 ; JUNGWIRTH et LAUNER, 1968 ; WALEN, 1971) sans que le mécanisme de cette inhibition ait été élucidé.

En ce qui concerne les formations tubulaires à structure hélicoïde observées entre des cellules adjacentes infectées, elles correspondent vraisemblablement à des néoformations et non à la dissociation de structures préexistantes. S'il en était autrement, leur présence sur coupes de cellules saines aurait difficilement pu échapper à l'observation. Quels que soient les plans de coupes, nous n'avons jamais observé de continuité entre ces tubules et la membrane plasmique ou des structures intracytoplasmiques et leur origine n'est pas connue.

Leur affinité pour le rouge de ruthénium et l'acide phosphotungstique a pH acide suggère qu'ils pourraient se former à partir de la couche mucopolysaccharidique recouvrant les cellules (glycocalyx).

CHAPITRE III

L'ENTOMOPOXVIRUS DU LEPIDOPTERE *AMSACTA*

Pages

I - CARACTERES GENERAUX DE LA MALADIE CHEZ LE LEPIDOPTERE *ESTIGMENE ACREA* 81

A - Origine 81

B - Symptômes et histopathologie 81

C - Spectre d'hôtes 82

II - LES INCLUSIONS 83

A - Structure des inclusions 83

B - Purification des inclusions 83

1 - Technique de purification 83

2 - Problèmes posés par la contamination des suspensions par des inclusions d'autres virus 84

C - Etude des conditions de solubilisation des inclusions 85

1 - Influence du pH 85

2 - Action des solvants organiques 86

3 - Action des composés réducteurs en milieu alcalin 86

4 - Action des sucs digestifs de l'hôte 87

Pages

D - Composition chimique des inclusions 87

1 - Teneur en ARN et ADN 87
2 - Teneur en protéines 88
3 - Spectre dans l'ultra-violet de la fraction protéinique des inclusions 88

E - Discussion 89

III - LE VIRION 91

A - Purification des virions 91

1 - Purification des virions libres 91
2 - Purification des virions par dissolution des inclusions 91

B - Structure du virion en contraste négatif 92

C - Etude de quelques propriétés des suspensions virales purifiées 93

1 - Spectre d'absorption dans l'ultra-violet 93
2 - Teneur en ADN et protéines du virion 93
3 - Discussion 94

D - Essais d'isolement de l'acide nucléique viral 95

1 - Techniques d'extraction 95
2 - Résultats 96
3 - Discussion 97

E - Mise en évidence d'activités enzymatiques dans le virion 99

1 - Nucléotide phosphohydrolase 99
2 - Désoxyribonucléases acide et neutre 101
3 - ARN polymérase 102
4 - Discussion 102

CHAPITRE III

L'ENTOMOPOXVIRUS DU LEPIDOPTERE *AMSACTA*

I - CARACTERES GENERAUX DE LA MALADIE CHEZ LE LEPIDOPTERE *ESTIGMENE ACREA*

A - Origine

L'entomopoxvirus d'*Amsacta moorei* a été découvert à l'occasion d'une épizootie survenue en 1967 au Rajasthan, en Inde, dans une population naturelle de ce lépidoptère. ROBERTS et GRANADOS (1968) ont observé dans des cadavres de larves de cet insecte de nombreux corps ovales fortement réfringents. Par contamination de nourriture artificielle avec une suspension enrichie en inclusions, ces auteurs ont réussi à reproduire la maladie chez la larve d'un lépidoptère américain de la même famille *(Arctiidae)*, *Estigmene acrea*. Ils ont observé au microscope électronique que ces inclusions renfermaient des particules ovoïdes de grande taille ressemblant à celles des poxvirus d'insectes décrits antérieurement. Ainsi fut reconnue la nature virale de la maladie, ces inclusions représentant l'équivalent des sphérules de l'entomopoxvirus de *Melolontha*.

Les travaux exposés dans ce chapitre ont tous été réalisés en utilisant l'hôte américain *Estigmene acrea*. Toutefois, le virus est nommé d'après son hôte d'origine, *Amsacta moorei*.

B - Symptômes et histopathologie

Les larves d'*Estigmene* présentent environ 10 jours après

infection *per os* des signes de paralysie de la partie postérieure du corps. Contrairement aux larves saines qui se replient instantanément sur elles-mêmes lorsqu'on les saisit avec des pinces, leur abdomen reste déroulé et leurs mouvements sont considérablement ralentis. A un stade avancé de la maladie, les larves gonflent et leur cuticule tendue se déchire à la moindre pression laissant s'écouler un liquide blanchâtre. La mort survient environ trois semaines après l'infection.

L'observation entre lame et lamelle d'une goutte d'hémolymphe prélevée sur une larve malade révèle de très nombreuses cellules sanguines dont le cytoplasme est rempli d'inclusions ovoïdes mesurant en moyenne 4 x 2,5 microns (Pl. XXXVII, Fig. 118). Les frottis renferment seulement ce type d'inclusions mais on ne trouve jamais de fuseaux.

Le principal site de multiplication virale est le tissu adipeux dont les cellules sont bourrées d'inclusions de virus en fin d'évolution de la maladie. Elles finissent par se désagréger, formant une bouillie très riche en inclusions (GRANADOS et ROBERTS, 1970). Les hémocytes et le tissu nerveux sont également le siège de multiplication virale (GRANADOS, 1971).

C - Spectre d'hôtes

En plus de l'hôte américain, *Estigmene acrea*, des essais d'infection de différents insectes ont montré que 2 autres espèces de lépidoptères sont sensibles au virus : *Lymantria dispar* et *Galleria mellonella*, cette dernière uniquement par inoculation de virions libres dans la cavité viscérale (ROBERTS et McCARTHY, 1972). Cherchant un hôte sensible facile à élever en France, nous avons essayé d'infecter des larves d'*Arctia caja*, espèce appartenant à la même famille que l'hôte d'origine. Après plusieurs essais infructueux, nous avons réussi récemment à infecter *per os* les larves de cette espèce. Des essais semblables d'infection de larves de noctuelles *Spodoptera littoralis* et *Mamestra brassicae* se sont soldés par des échecs. Enfin, l'inoculation de suspensions virales infectieuses dans la boîte crânienne de souriceaux ou dans les veines et sous la peau de lapins n'a été suivi d'aucun effet pathologique décelable.

II - LES INCLUSIONS

Ainsi que nous l'avons précisé ci-dessus, seules les inclusions ovoïdes renfermant des virions sont produites dans les cellules d'*Estigmene* infectées par le virus. C'est donc à ce type de structure que nous nous référons dans ce chapitre, en utilisant le terme d'inclusions.

A - Structure des inclusions

Observées au microscope photonique, les inclusions apparaissent comme des corps réfringents ayant une forme allongée sensiblement ovale (Pl. XXXVII, Fig. 119). Quel que soit le mode d'observation (fond clair ou contraste de phase), on ne reconnaît aucune structure à l'intérieur de ces inclusions. Sur coupes ultra-fines observées au microscope électronique, le contour des inclusions est parfois irrégulier avec de nombreuses bosses correspondant à des virions inclus ou en voie d'inclusion dans la zone périphérique (Pl. XXXVIII, Fig. 120). A l'intérieur de l'inclusion, les virions sont disposés sans ordre apparent mais toujours nettement séparés les uns des autres. On ne reconnaît pas de zone corticale comme dans les sphérules de l'entomox de *Melolontha*. Dans les plans de coupes favorables, la trame cristalline des inclusions se distingue nettement (Pl. XXXVIII, Fig. 120).

B - Purification des inclusions

1 - Technique de purification

Les inclusions sont purifiées soit à partir de larves entières, soit à partir de tissu adipeux broyé pendant 4 minutes dans un "Waring Blendor". Afin d'éviter la mélanisation des suspensions, les broyats sont effectués à 0°C dans un tampon Tris 0,2 M contenant 2 % d'acide ascorbique et amené à pH 7,6 avec de l'HCl 0,2 M. Le prélèvement du tissu adipeux permet d'éviter la présence dans ces broyats des poils qui recouvrent le tégument des larves et qui sédimentent dans des conditions semblables aux inclusions, aussi bien en centrifugation différentielle qu'en gradient de densité. Un broyage mélangé des larves permet toutefois de ne pas trop fragmenter les

poils que l'on peut alors éliminer en grande partie par filtration sur une double épaisseur de gaze. Les filtrats subissent ensuite un traitement doux aux ultrasons, pendant 15 secondes environ, à une puissance de 20 watts à la température de 0°C avec un appareil Branson, Modèle 185 E. Les tissus adipeux sont traités dans les mêmes conditions pendant 2 minutes. Les inclusions sont envoyées au culot par centrifugation à 300 g pendant 5 minutes à température ambiante. Les culots repris dans l'eau sont sédimentés à 50 g, 1 minute, pour éliminer les gros débris tissulaires. Ce cycle à moyenne et basse vitesses est répété plusieurs fois jusqu'à l'obtention d'un culot blanchâtre fortement enrichi en inclusions. En partant de tissu adipeux, on obtient après trois cycles une suspension d'inclusions pratiquement pure.

Les inclusions reprises dans l'eau et déposées au sommet de gradients linéaires de sucrose 40-65 % ou 50-65 % (p/p) préparés dans des tubes de 38 ml sont centrifugés de 1 à 2 heures dans le rotor Beckman SW 27 à 24.000 rpm (104.000 g) à 5°C. Les inclusions sédimentent à l'équilibre dans une bande de densité 1,292 (détermination par réfractométrie). Les gradients sont récupérés à l'aide d'un fractionneur de gradient ISCO en fractions de 0,25 ml pour les mesures de densité ou par pipetage à l'aide d'une pompe péristaltique lors des purifications de routine.

2 - *Problèmes posés par la contamination des suspensions par des inclusions d'autres virus*

Au cours de certains essais et dans les premières infections d'*Estigmene acrea* avec l'entomopoxvirus, deux autres virus à corps d'inclusion furent identifiés par la présence de leurs inclusions dans les broyats de larves. Il s'agit d'un virus de polyédrie nucléaire et d'un virus de polyédrie cytoplasmique. Le premier était présent dans les cadavres du lépidoptère *Amsacta moorei* en provenance de l'Inde et s'est multiplié chez *Estigmene acrea* en même temps que l'entomopoxvirus. Le deuxième est apparu dans les élevages effectués à partir d'oeufs non désinfectés provenant du sud de la Californie. Ces deux types d'inclusions ont pu être séparés des inclusions de l'entomopoxvirus par centrifugation en gradient de densité. Les inclusions du virus de polyédrie nucléaire sédimentent dans une bande de densité 1,256, nettement au-dessus de celle des inclusions de l'entomopox, dans un gradient

de sucrose 50-65 %. Les inclusions de virus de polyédrie cytoplasmique, par contre, sédimentent dans une bande de densité 1,278, voisine de celle des inclusions de l'entopomox et la portion du gradient située entre ces deux bandes contient un mélange des deux inclusions. La séparation de ces deux types d'inclusions nécessite de ce fait un fractionnement minutieux pour séparer et éliminer la zone de mélange. Cette séparation s'effectue d'autant mieux que la quantité de matériel déposée au sommet des gradients est faible.

Les inclusions de virus de polyédrie cytoplasmique contaminant les suspensions d'inclusions de l'entomopoxvirus ont pu être éliminées en mettant à profit les différences de solubilité entre ces deux types d'inclusions. Alors que les premières sont solubles dans des solutions alcalines faibles, les deuxièmes nécessitent en plus la présence d'un agent réducteur (voir section suivante). Expérimentalement, une suspension contenant les deux types d'inclusions est préparée à la concentration de 3×10^6 inclusions de chaque type par ml (comptage à la cellule de Thoma). Différents essais de concentration de solutions de carbonate de sodium ont permis d'établir que, dans un mélange volume à volume de suspension d'inclusions et de Na_2CO_3 0,05 M, les inclusions du virus de polyédrie cytoplasmique sont dissoutes en 5 minutes alors que les inclusions de l'entomopoxvirus ne sont pas attaquées. La réaction est arrêtée après 15 minutes par addition d'un même volume de tampon Tris-HCl 0,2 M à pH 7,6. Les suspensions déposées au sommet d'un tube contenant du sucrose à 40 % (p/p) sont centrifugées et les inclusions de l'entomopoxvirus sont recueillies sur un coussin de sucrose à 65 % (p/p).

C - Etude des conditions de solubilisation des inclusions

Nous avons recherché les conditions de solubilisation des inclusions de l'entomopoxvirus d'*Amsacta* susceptibles de conserver au mieux l'intégrité des virions qu'elles renferment.

1 - Influence du pH

Mises en contact avec une solution de soude 0,1 N, les inclusions gonflent en quelques minutes et les virions qu'elles renferment sont

libérés au bout de 15 minutes environ et dissous presque instantanément. Dans une solution de carbonate de sodium 1 M, pH 11,6, les inclusions gonflent légèrement mais, au bout de 2 heures, elles ne sont toujours pas dissoutes. Après plusieurs heures dans le tampon HCl-KCl 0,1 M, pH 2,2, elles n'ont subi aucune modification notoire.

2 - *Action des solvants organiques*

A température ambiante, les inclusions sont insolubles dans l'éthanol, le chloroforme, l'éther éthylique et l'acétone.

3 - *Action des composés réducteurs en milieu alcalin*

A l'image des sphérules de l'entomopoxvirus de *Melolontha*, les inclusions de l'entomopoxvirus d'*Amsacta* ne peuvent être dissoutes aux environs de pH 10 qu'en présence de composés réducteurs comme le 2-mercaptoéthanol ou le thioglycolate de sodium. C'est ainsi, par exemple, qu'en présence de 2-mercaptoéthanol 0,02 M dans un tampon carbonate-bicarbonate 0,08 M amené à pH 10,3 par de la soude, la plupart des inclusions sont dissoutes en 15 minutes. De même, elles se dissolvent en quelques minutes dans une solution de thioglycolate de sodium 0,08 M dans un tampon carbonate-bicarbonate 0,16 M à pH 10,5. La dissolution des inclusions en milieu alcalin réducteur peut être suivie au microscope photonique. On observe un craquèlement des inclusions et l'apparition de rides à leur surface (Pl. XXXIX, Fig. 121). Les inclusions gonflent ensuite rapidement et perdent leur réfringence. Les virions deviennent alors apparents sous la forme de petites granulations sphériques fortement réfringentes (Pl. XXXIX, Fig. 122). Ils sont animés de mouvements browniens intenses à l'intérieur de l'inclusion. Celle-ci finit par éclater et les virions se dispersent alors dans le milieu.

L'attaque par une solution de thioglycolate-bicarbonate 0,125 M à pH 10,5, d'inclusions déposées sur une grille porte-objet, produit après 30 secondes d'action de la solution une dissolution partielle de nombreuses inclusions. Leur opacité aux électrons est fortement diminuée et les virions qu'elles renferment se distinguent alors nettement (Pl. XXXIX, Fig. 123).

4 - Action des sucs digestifs de l'hôte

Si l'on recueille sur une lame histologique une goutte de jus régurgité par une larve d'*Estigmene* lorsqu'on la manipule et si l'on mélange à cette goutte une goutte de suspension d'inclusions, on observe au microscope en contraste de phase la dissolution très rapide (une minute au plus) des inclusions. Nous avons également étudié cette dissolution au microscope électronique. Une suspension d'inclusions est déposée sur grille porte-objet et l'excès de liquide est pipeté. On dépose alors une goutte de liquide régurgité par les larves et on laisse agir pendant 1 ou 2 minutes, puis on rince la grille avec une solution tamponnée d'acide phosphotungstique qui sert en même temps à la coloration. Après 1 minute de contact, les inclusions sont dissoutes pour la plupart et les images obtenues ressemblent à celles de la dissolution par le thioglycolate. Lorsqu'on laisse agir le suc digestif pendant 2 minutes, la plupart des virions sont pénétrés par l'APT, ce qui indique un début d'attaque.

Le pH du suc digestif régurgité mesuré sur plusieurs échantillons s'est avéré fortement alcalin et voisin de 12. Après chauffage à 60°C pendant 30 minutes, le pouvoir de dissolution du liquide régurgité demeure inchangé.

D - Composition chimique des inclusions

1 - Teneur en ARN et ADN

L'ARN et l'ADN contenus dans les inclusions purifiées sont extraits par hydrolyse à la potasse 1 N à 37°C pendant 20 heures suivie d'une hydrolyse à l'acide perchlorique 0,5 N à 70°C pendant 30 minutes (méthode de SCHMIDT et THANNHAUSER, 1945).

Nous avons également essayé d'autres techniques d'extraction de l'ARN et de l'ADN faisant intervenir seulement l'hydrolyse acide (OGUR et ROSEN, 1950 ; SCHNEIDER, 1945). Ces techniques ont donné des résultats moins reproductibles, les inclusions étant insolubles en milieu acide. L'ARN et

l'ADN sont dosés respectivement par la méthode à l'orcinol chlorhydrique (MEJBAUM, 1939) et la méthode à la diphénylamine (GILES et MYERS, 1965). Les valeurs moyennes obtenues à partir de 3 échantillons correspondent à 2,44 µg d'ARN et 3,95 µg d'ADN par milligramme d'inclusions (voir tableau X).

Tableau X

TENEUR EN ARN, EN ADN ET EN PROTEINES
DES INCLUSIONS DE L'ENTOMOPOXVIRUS D' *Amsacta*

Echantillon	Poids d'inclusions (mg)	ARN (1)	ADN (1)	Protéines (1)
1	23,19	2,25	3,88	1.006
2	28,19	2,73	3,86	953
3	26,80	2,35	4,11	1.002
Moyenne (1)		2,44	3,95	986

(1) Exprimé en µg par mg d'inclusions.

2 - *Teneur en protéines*

Les culots d'extraction des acides nucléiques sont repris dans la soude normale et, après dilution, les protéines sont dosées selon la méthode de LOWRY et al. (1951) en prenant une solution de sérum albumine bovine cristallisée comme étalon. La teneur en protéines ainsi estimée correspond à 98 % en moyenne du poids sec d'inclusions (voir tableau X).

3 - *Spectre d'absorption dans l'ultra-violet de la fraction protéinique des inclusions*

La fraction protéinique des inclusions est préparée de la façon suivante :

Les inclusions sont dissoutes dans le tampon thioglycolate de sodium 0,032 M + Na_2CO_3 0,08 M à pH 10,5. Dès les premiers signes d'éclatement des inclusions, la suspension est centrifugée à 23.000 g pendant 30 minutes. Le surnageant est prélevé et précipité par addition goutte à goutte d'acide sulfurique I N. La précipitation se produit à pH 5,5-5,2. Le précipité est laissé à 4°C pendant 1 à 2 heures puis centrifugé 10 minutes à 10.000 g. Le culot est dissous dans de la soude 0,001 M et centrifugé à 10.000 g pendant 15 minutes. Le soluté est à nouveau précipité, centrifugé et remis en solution comme précédemment. La solution est alors transférée dans un boyau de cellophane et dialysé à 4°C contre le tampon Tris-HCl 0,05M à pH 7,4. Le tampon de dialyse est renouvelé deux fois à 24 heures d'intervalle.

Le spectre d'absorption dans l'ultra-violet d'une solution de protéines d'inclusions est représenté sur la figure 124 (Pl. XL). Il présente un maximum à 277 nm, un minimum à 247 nm et un épaulement à 283 nm. Ce spectre n'est pas modifié par les conditions de solubilisation des inclusions, de précipitation des protéines ni par la nature du tampon de dialyse tant que le pH est inférieur à 10. Si, par contre, on dissout les protéines dans la soude 0,01 N (à pH voisin de 12), on constate une dérive du maximum et du minimum vers des longueurs d'onde plus grandes avec diminution du rapport DO_{280}/DO_{260}. Ces propriétés spectrales sont identiques à celles que nous avons trouvées pour les protéines de sphérules et de fuseaux de l'entomopoxvirus de *Melolontha*. Elles indiquent, en particulier, une teneur élevée en résidus tyrosine des inclusions de l'entomopoxvirus d'*Amsacta*.

E - Discussion

L'étude des inclusions de l'entomopoxvirus d'*Amsacta* a montré que si elles ne diffèrent pas fondamentalement des sphérules de l'entomopoxvirus de *Melolontha*, elles s'en distinguent cependant par un certain nombre de caractères que nous envisagerons ci-dessous.

Tout d'abord sur le plan de la morphologie, leur petite taille, leur forme allongée et l'absence de rangement apparent des virions au sein de la trame cristalline contrastent avec la grande taille et l'organisation des

sphérules. L'absence de fuseaux associés aux inclusions de virions est également une propriété remarquable de cette virose.

A l'image des sphérules, les inclusions de l'entomopoxvirus d'*Amsacta* ne sont solubles en milieu alcalin faible qu'en présence d'un agent réducteur, ce qui implique la présence dans leurs molécules de ponts disulfure. Toutefois, leur solubilisation est possible à des concentrations de réducteurs plus faibles. Cette différence peut provenir de la taille plus faible des inclusions qui sont de 5 à 10 fois plus petites que les sphérules et contiendraient de ce faitune quantité moindre de résidus cystine. Il est possible, de plus, que le pourcentage de ces résidus dans la fraction protéinique de ces inclusions soit moins grand.

La dissolution rapide des inclusions par le liquide régurgité par les larves d'*Estigmene* contraste avec la lenteur de dissolution des sphérules dans le suc digestif de *Melolontha*. Le pH très alcalin du suc digestif d'*Estigmene* est sans doute responsable de ce phénomène et le maintien du pouvoir dissolvant après chauffage à 60°C pendant 30 minutes suggère que cette propriété n'est pas liée à une action enzymatique. D'après nos observations d'inclusions attaquées sur grilles par le liquide régurgité par les larves, les virions sont rapidement dégradés par celui-ci et il est vraisemblable que, dans ces conditions, la plupart des virions libérés dans l'intestin antérieur sont détruits avant d'atteindre l'intestin moyen où doit se faire la pénétration. Cette observation est à rapprocher des travaux de STOLTZ et SUMMERS (1971) qui ont montré, au microscope électronique, la destruction rapide des virions d'un iridovirus de moustique dans la partie antérieure de l'intestin de son hôte.

La composition chimique globale des inclusions est proche de celle des sphérules de *Melolontha*, bien que leur teneur en ARN et ADN soit supérieure. Ces différences dans la teneur en acides nucléiques rappellent celles observées chez les inclusions de baculovirus (voir section II F du chapitre II).

III - LE VIRION

A - Purification des virions

1 - *Purification des virions libres*

La technique utilisée est identique à celle décrite pour la purification des virions libres de l'entomopoxvirus de *Melolontha*, à savoir : broyage du tissu adipeux dans le tampon ascorbate-Tris, clarification, envoi au culot des virions qui sont repris dans un tampon glycine-NaOH et centrifugation en gradients de densité linaire de sucrose ou de tartrate de potassium.

Différents essais de purification des virions dans ces conditions n'ont pas abouti à des résultats quantitatifs intéressants. Les raisons de ces insuccès sont probablement analogues à celles mentionnées lors de la purification des virions libres de l'entomopoxvirus de *Melolontha*, à savoir la variation du nombre de virions libres d'un lot à l'autre en fonction de la date d'infection et le fort asynchronisme du développement viral dans le tissu adipeux (voir section III B du chapitre II). A la suite de ces essais infructueux, nous avons purifié les virions à partir des inclusions.

2 - *Purification des virions par dissolution des inclusions*

Les inclusions purifiées sont dissoutes dans une solution de carbonate de sodium 0,8 M + thioglycolate de sodium 0,006 M. La plupart des inclusions sont dissoutes en 2 minutes dans cette solution. Pour uniformiser les conditions de dissolution, on mélange volume à volume la solution alcaline et une suspension contenant 10^9 inclusions/ml. Après avoir constaté que les solutions de saccharose arrêtaient la dissolution des inclusions, nous avons utilisé cette propriété en pensant qu'elle permettrait également de préserver l'intégrité des virions libres. La solution contenant les inclusions dissoutes est donc mélangée au bout de 2 minutes avec un volume égal de solution de sucrose à 60 % (p/p). Le mélange déposé au sommet de gradients linéaires de sucrose 40-60 % (p/p) est centrifugé à 24.000 rpm, à 5°C, dans un rotor Beckman SW 27, pendant 60, 90 ou 120 minutes. Les zones conte-

nant les virions sont collectées à l'aide d'un fractionneur de gradient ISCO. Après 2 heures de centrifugation, on obtient une seule bande de virions contenant dans sa partie inférieure quelques inclusions partiellement dissoutes. Si l'on centrifuge pendant 1 heure seulement, on obtient deux bandes, l'une légèrement au-dessous du milieu du tube, l'autre aux 3/4 de sa hauteur. La bande supérieure contient des virions isolés ou de petits agrégats, la bande inférieure contient essentiellement de gros agrégats avec quelques inclusions incomplètement dissoutes. La densité optique ne revient pas au zéro entre les deux bandes, probablement à cause d'agrégats de taille intermédiaire. La densité de la bande inférieure contenant les gros agrégats est de 1,243 (mesure par réfractométrie). Les inclusions non dissoutes se concentrent dans une bande située au-dessous de la bande inférieure de virions.

Les suspensions de virions sont dialysées à 4°C contre 100 à 200 fois leur volume de tampon Tris-HCl 10^{-3} M à pH 8,6 et le tampon de dialyse renouvelé 2 fois à 24 heures d'intervalle.

La purification des virions de l'entomopoxvirus d'*Amsacta* soulevant des problèmes analogues à ceux rencontrés lors de l'étude de l'entomopoxvirus de *Melolontha* nous renvoyons le lecteur à la discussion de ce sujet (voir section III B du chapitre II).

B - Structure du virion en contraste négatif

Les virions purifiés, comme il a été précisé ci-dessus, apparaissent au microscope électronique, après coloration négative à l'APT, comme des corpuscules ovales de 3.500 Å de long sur 2.500 Å de large (Pl. XLI, Fig. 125). Leur surface porte de nombreux éléments globuleux d'environ 400 Å de diamètre donnant à la particule l'aspect de mûre caractéristique des poxvirus d'insectes. Plus de 90 % des virions purifiés présentent cet aspect mûriforme. Lorsque l'APT pénètre dans la particule, on reconnaît à l'intérieur de l'enveloppe un nucléoïde cylindrique flanqué de deux corps latéraux discrets (Pl. XLI, Fig. 126). Si on laisse les virions en contact prolongé avec le tampon thioglycolate, la plupart d'entre eux sont dégradés et l'on observe dans les préparations de nombreuses enveloppes vides et des nucléoïdes libres (Pl. XLI, Fig. 127 et 128).

La comparaison entre structure de l'entomopoxvirus d'*Amsacta* et des autres entomopoxvirus et poxvirus de vertébrés sera développée dans les chapitres suivants.

C - Etude de quelques propriétés des suspensions virales purifiées

1 - *Spectre d'absorption dans l'ultra-violet*

Le spectre d'absorption dans l'ultra-violet d'une suspension de virions est présenté sur la figure 129 (Pl. XLII). On note un palier entre 280 et 260 nm sans maximum distinct. Comme pour les suspensions de virions de l'entomopoxvirus de *Melolontha*, l'absorption spécifique due à l'acide nucléique et aux protéines virales dans cette région du spectre est totalement masquée par la diffraction de la lumière par les virions. Ce spectre corrigé par la diffraction de la lumière selon la méthode de BONHOEFFER et SCHACHMAN (voir chapitre II, section III C) présente un maximum vers 275 nm et un minimum vers 260 nm (Pl. XLII, Fig. 130). Le rapport DO_{260}/DO_{280} est de 0,85 à 250 nm, 90 % de l'absorption est due à la diffraction de la lumière par les virions.

2 - *Teneur en ADN et en protéines du virion*

Les suspensions de virions devant servir aux analyses d'ADN et de protéines sont préalablement analysées au spectrophotomètre pour mesurer leur densité optique à 260 nm et définir ainsi le nombre d'unités de densité optique (UDO_{260}) qu'elles contiennent par ml (voir chapitre II, section III C). Les virions sont ensuite envoyés au culot par centrifugation à 12.000 g pendant 30 minutes et les surnageants éliminés. Après avoir identifié l'acide nucléique viral comme étant un ADN, nous en avons effectué le dosage. L'ADN est extrait à l'acide perchlorique 0,5 M pendant 15 minutes à 70°C et dosé par le réactif à la diphénylamine selon GILES et MYERS (1965). Pour le dosage des protéines virales, les culots de virions sont hydrolysés dans la soude normale pendant au moins 1 heure et les hydrolysats analysés par la méthode de LOWRY et al. (1951). Les solutions étalon d'ADN et de sérum albumine bovine ayant servi aux analyses sont traitées dans les mêmes conditions. Les résultats

d'analyses de 4 échantillons de virus sont consignés dans le tableau XI. La teneur moyenne en ADN et en protéines des suspensions de virions est de 0,79 et 57,0 µg par UDO_{260}. Le pourcentage d'ADN dans les virions est de 1,38 %.

Tableau XI

TENEUR EN ADN ET EN PROTEINES DES VIRIONS DE L'ENTOMOPOXVIRUS D'*Amsacta* PURIFIES PAR DISSOLUTION DES INCLUSIONS

Préparation	UDO_{260} (1)	ADN		Protéines		% ADN
		µg/ml	µg/UDO_{260}	µg/ml	µg/UDO_{260}	
1	3,26	2,440	0,748	181,0	55,6	1,33
2	2,36	2,015	0,855	148,0	52,9	1,34
3	3,16	2,625	0,831	184,6	58,4	1,40
4	0,51	0,370	0,727	26,0	51,0	1,40
Moyenne			0,790		57,0	1,38

(1) définie comme la quantité de matériel ayant une densité optique de 1 à 260 nm dans une cuve de 1 cm de trajet optique.

3 - *Discussion*

Tant par leurs propriétés spectrales que leur composition chimique, les virions de l'entomopoxvirus d'*Amsacta* diffèrent peu de ceux de l'entomopoxvirus de *Melolontha* (voir section III C du chapitre II). Leur teneur en ADN est toutefois plus faible et ne représente qu'environ 1/4 de celle du virus vaccinal. Comme pour l'entomopoxvirus de *Melolontha*, nous pensons que ces résultats doivent être confirmés par des analyses effectuées sur des virions libres.

D - Essais d'isolement de l'acide nucléique viral

1 - *Techniques d'extraction*

Nous avons essayé d'isoler l'ADN contenu dans les virions sous sa forme native afin de caractériser le génome viral. Pour cela, nous avons utilisé deux méthodes d'extraction, la méthode de GAFFORD et RANDALL (1967) et celle de JOKLIK (1962b), mises au point toutes deux pour extraire des ADN de poxvirus de vertébrés.

La première, utilisée pour extraire l'ADN du virion de la variole aviaire (fowlpox) fait intervenir l'action successive d'une solution alcoolique de dodecyl sulfate de sodium (SDS) et d'un mélange chroforme-butanol. La deuxième est la méthode préconisée par JOKLIK pour extraire l'ADN des virions de la variole bovine (cowpox). Cette méthode utilise successivement l'action du 2-mercaptoéthanol, du SDS, de la pronase et du phénol. Les culots de virus sont mis en suspension dans 20 ml d'alcool absolu et laissés précipiter à température ambiante pendant 1 heure, puis centrifugés. Ils sont ensuite délipidés dans 20 ml d'un mélange alcool-éther (v/v), centrifugés et lavés dans 5 ml de tampon citrate de soude 0,015 M + NaCl 0,15 M à pH 7 (tampon SSC). Après centrifugation, les culots sont repris dans 1 ml de tampon SSC et on ajoute à la suspension 25 µl de 2-mercaptoéthanol. La solution est conservée à température ambiante pendant 1 heure puis on ajoute 15 µl d'une solution dans l'eau de SDS à 20 % et 0,2 mg de pronase. La solution est alors placée à 37°C dans un bain-marie pendant la nuit, temps au bout duquel les virions sont complètement dissous. On ajoute alors 1,5 ml de phénol saturé d'eau et on agite le tube pendant 10 minutes à température ambiante. La phase aqueuse est récupérée avec une pipette à large ouverture et l'extraction au phénol est répétée une fois encore. Le phénol présent dans la phase aqueuse est enlevé par trois extractions successives par l'éther à volume égal. L'excès d'éther est entraîné par un courant faible d'azote. La solution d'ADN transférée dans un tube à dialyse est dialysée contre 1 l de tampon SSC. Après transfert dans un tube conique, l'ADN est précipité par addition de deux volumes d'alcool 95 % et récupéré sur une baguette de verre. Il est rincé à l'éthanol 80 % puis déposé dans du tampon SSC, à 4°C, et laissé plusieurs heures pour obtenir sa solubilisation.

2 - Résultats

Les essais d'extraction de l'ADN viral par la méthode de GAFFORD et RANDALL (1967) n'ont pas permis l'obtention de solutions suffisamment purifiées d'ADN. Leur spectre dans l'ultra-violet présentait toujours une absorption trop importante à 280 nm par rapport à celle mesurée à 260 nm, indiquant la présence d'un contaminant protéinique. Des essais d'extraction de la solution d'ADN par le phénol selon KIRBY (1967) n'ont pas réussi à éliminer ce contaminant. En fait, on constate que même après 3 heures d'incubation à température ambiante dans la solution de SDS, les virions ne sont pas totalement dissous. Il est vraisemblable, dans ces conditions, que certaines protéines fortement liées à la chaîne d'ADN ne soient pas totalement éliminées.

La deuxième technique, celle de JOKLIK, a donné de meilleurs résultats. Trois préparations d'ADN ont été faites selon cette technique. Le spectre d'une de ces préparations est représenté sur la figure 131 (Pl. XLIII). Le maximum d'absorption se situe à 260 nm, le minimum à 236 et les rapports DO_{260}/DO_{280} et DO_{260}/DO_{240} sont respectivement de 1,76 et 1,83.

Sur cette préparation, nous avons effectué une détermination approximative du coefficient de sédimentation de l'ADN en utilisant la technique suivante. L'ADN précipité par l'alcool est repris dans 0,2 ml d'une solution de Tris 0,1 M, KCl 0,01 M et EDTA 0,001 M à pH 7,5. Un volume de 0,1 ml de cette solution est déposé au sommet d'un tube contenant un gradient de sucrose préformé linéaire de 10-40 %. Dans un autre tube, on ajoute à 0,1 ml de solution d'ADN, 0,1 ml de suspension de virus de l'énation de pois comme marqueur (*). Après 2 heures 1/2 de centrifugation à 39.000 rpm dans un rotor Beckman SW 41, les gradients sont analysés à l'appareil ISCO. Connaissant le rapport des distances au sommet du tube du pic du virus et de celui de l'ADN et le coefficient de sédimentation du virus de l'énation de pois (94 S), on en déduit celui de l'ADN. Ce coefficient était de 43 S. L'équation

---

(*) Le choix de ce marqueur tient au fait que nous disposions, au moment de cette expérience, d'une suspension hautement purifiée de ce virus.

de HERSHEY et Coll. (1961) reliant le coefficient de sédimentation au poids moléculaire : $M^{0,55} = \frac{S}{0,0022}$ permet d'estimer à 65×10^6 le poids moléculaire de l'ADN extrait du virion.

3 - *Discussion*

L'isolement, sous sa forme native, du génome des poxvirus présente certaines difficultés inhérentes à sa localisation et à sa grande taille.

Depuis les travaux de PETERS et de son équipe (voir chapitre V), on sait que l'ADN des poxvirus est localisé à l'intérieur du nucléoïde. Il faut donc dégrader les virions jusqu'à la rupture de l'enveloppe du nucléoïde pour libérer le génome et le débarrasser ensuite des protéines auxquelles il est fortement lié (JOKLIK, 1966). Dans le cas du virion de la variole aviaire, particulièrement riche en lipides (RANDALL et al., 1964), un traitement au SDS suivi d'une ou deux extractions au mélange chloroforme-butanol suffisent à extraire le génome dans des conditions satisfaisantes (GAFFORD et RANDALL, 1967). Pour d'autres poxvirus, par contre, des traitements plus énergiques sont nécessaires. C'est ainsi que, parmi les nombreuses techniques essayées par JOKLIK (1962b) pour extraire l'ADN des virions du cowpox, seule celle que nous avons utilisée lui a donné satisfaction. Cet auteur a toutefois constaté qu'un faible pourcentage (3 à 5 %) de protéine restait lié aux molécules d'ADN. C'est également cette technique que JACQUEMONT et ses collaborateurs (1969) et YOHN et CALLAGHER (1969) ont adopté pour isoler l'ADN des virions du fibrome de SHOPE et de la tumeur YABA, respectivement. La facilité plus ou moins grande avec laquelle on peut extraire le génome des poxvirus reflète vraisemblablement la plus ou moins grande cohésion des composants structuraux des virions de ce groupe.

Des deux techniques que nous avons utilisées, celle mettant en oeuvre l'action successive du 2-mercaptoéthanol, du SDS, de la pronase et du phénol (technique de JOKLIK modifiée) semble la mieux adaptée au poxvirus d'*Amsacta*. A cet égard, ce virus se rapproche plus du cowpox que du virus de la variole aviaire. Toutefois, nous n'avons pas réussi à éliminer totalement certains contaminants protéiniques probablement responsables de la valeur relativement faible (< 1,8) du rapport DO_{260}/DO_{280} de nos préparations.

La deuxième difficulté dans l'isolement des ADN des poxvirus tient à la grande taille de leur molécule et par conséquent à leur fragilité.

Etudiant le génome du virion vaccinal à la fois par ses propriétés de sédimentation et par l'observation directe au microscope électronique des molécules, SAROV et BECKER (1967) ont estimé son poids moléculaire à 160×10^6 daltons. La molécule d'ADN est linéaire et sa longueur moyenne est de 87 nm (BECKER et SAROV, 1968). Par des techniques analogues, GAFFORD et RANDALL (1967) et HYDE et collaborateurs (1967) ont estimé le poids moléculaire du génome du virion de la variole aviaire à 200×10^6 daltons et la longueur moyenne de la molécule d'ADN à 100 nm. Il est évident que des molécules aussi longues sont très fragiles et les auteurs cités plus haut recommandent le plus grand soin pour éviter de rompre les chaînes au cours des étapes de leur extraction. Il est intéressant à ce sujet de noter que la première tentative d'estimation du poids moléculaire d'un ADN extrait d'un poxvirus, effectuée par JOKLIK en 1962 sur le cowpox, a conduit cet auteur à la conclusion que les molécules dans ses préparations étaient fragmentées.

L'estimation du poids moléculaire de l'ADN du poxvirus d'*Amsacta* à 65×10^6 daltons d'après une seule mesure approchée de son coefficient de sédimentation ne peut être considérée comme une valeur sûre. Des mesures plus précises de ce paramètre utilisant un ADN de haut poids moléculaire comme marqueur sont en effet nécessaires pour vérifier ce premier résultat. Si l'on considère le haut poids moléculaire des ADN des poxvirus analysés jusqu'à présent (entre 160×10^6 et 200×10^6 daltons), cette valeur est nettement inférieure et indiquerait que les chaînes d'ADN que nous avons isolées étaient fragmentées. Si, au contraire, on se réfère à la faible teneur en ADN des virions donnée par l'analyse chimique (1,4 % contre 5 % pour les poxvirus de vertébrés), et en supposant que ces derniers ne possèdent pas de fraction autre que protéinique pondéralement importante, il faut admettre qu'à taille égale (ou légèrement supérieure), les virions du poxvirus d'*Amsacta* renferment une molécule d'ADN de poids moléculaire environ trois fois plus faible que celui des virions de poxvirus de vertébrés. Dans l'état actuel de nos connaissances, cette importante question ne peut trouver de réponse.

E - Mise en évidence d'activités enzymatiques dans le virion

La mise en évidence d'activités enzymatiques dans les virions purifiés de différents poxvirus de vertébrés représente une contribution importante de ces dernières années à la connaissance de la biologie des virus de ce groupe. On connaît actuellement cinq enzymes chez ces virus localisés semble-t-il dans le nucléoïde des virions et qui sont : une ARN polymérase ADN dépendante ou transcriptase (KATES et McAUSLAN, 1967 ; MUNYION et al., 1967) ; une nucléotide phosphohydrolase ou NPH (MUNYION et al., 1968 ; GOLD et DALES, 1968) ; deux désoxyribonucléases (DNases), l'une à pH optimum d'action 5,0 est une exonucléase, l'autre est une endonucléase dont le pH optimum d'action est 7,8 (POGO et DALES, 1969) et une protéine kinase (PAOLETTI et MOSS, 1972).

Nous avons recherché la présence de 4 de ces enzymes dans les virions du poxvirus d'*Amsacta* purifiés selon la technique décrite précédemment, dans le but d'établir des comparaisons entre poxvirus de vertébrés et d'invertébrés (*). Les techniques utilisées pour la mesure des activités enzymatiques sont décrites en détail dans les travaux cités ci-dessus et ne seront pas exposées ici. Elles consistent à incuber dans des tampons appropriés des suspensions de virions intacts ou dégradés selon la technique d'EASTERBROOK (1966), en présence d'un substrat marqué par un isotope radioactif. Après un temps déterminé d'incubation, les produits de la réaction enzymatique sont extraits et leur radioactivité mesurée au compteur à scintillation liquide. Pour chaque essai, 50 à 100 µg de protéine virale, déterminée par colorimétrie et spectrophotométrie UV, sont utilisés.

1 - *Nucléotide phosphohydrolase*

Le substrat utilisé pour mesurer l'activité de la NPH était de l'ATP-γ-^{32}P (activité spécifique 647 mCi/mM). Après une heure d'incubation à 37°C, le phosphate radioactif inorganique produit par hydrolyse de

---

(*) Ce travail a été effectué au laboratoire du Dr S. DALES du Public Health Research Institute of the City of New York, New York U.S.A., en collaboration avec le Docteur B.G.T. POGO.

l'ATP est extrait et sa radioactivité mesurée au compteur à scintillation (GOLD et DALES, 1968). Les résultats de mesures d'activité de la NPH dans 4 préparations différentes (tableau XII) montrent que cet enzyme est présent dans les virions de l'entomopoxvirus d'*Amsacta* et que son activité est comparable à celle trouvée dans les virions de la vaccine (GOLD et DALES, 1968) et de la tymeur Yaba (SCHWARTZ et DALES, 1971). Comme pour ces derniers, le traitement des virions par le NP-40 et le 2-mercaptoéthanol n'est pas nécessaire pour activer l'enzyme, ceci étant probablement dû au fait que l'enveloppe des virions est perméable au substrat. Les inhibiteurs des ATPases cellulaires comme l'ouabaïne et la rutamycine ne réduisent pas l'activité de la NPH des virions, indiquant l'absence de contamination par l'ATPase microsomale activée par les ions Na^+ et K^+ ou l'ATPase mitochondriale. Nous avons également vérifié que la protéine des inclusions, contaminant possible des suspensions virales, était dépourvue de toute activité NPHasique.

Tableau XII

ACTIVITE DE LA NUCLEOTIDE PHOSPHOHYDROLASE
DANS LES VIRIONS PURIFIES DES POXVIRUS

Origine des virions	Traitements subis par les virions	nmoles ATP-γ-^{32}P hydrolysées/mg protéine virale/heure
Amsacta		35,0[a] (30-48)
"	NP-40 + 2-mercaptoéthanol	39
"	sans NP-40 ni 2-mercaptoéthanol	41,0
"	ouabaïne, Na^+, K^+	45,0
"	rutamycine 10 µg	41,0
vaccine	NP-40 + 2-mercaptoéthanol	40,0[b]
tumeur Yaba	NP-40 + 2-mercaptoéthanol	59,0[c]

(a) moyenne de 7 mesures. Les valeurs entre crochets correspondent aux valeurs extrêmes.
(b) d'après GOLD et DALES (1968)
(c) d'après SCHWARTZ et DALES (1971).

2 - *Désoxyribonucléases acide et neutre*

La mise en évidence d'activités DNasiques a été réalisée en incubant des suspensions de virions débarrassés de leur enveloppe avec de l'ADN natif et dénaturé extrait de cellules L après marquage au ^{14}C (POGO et DALES, 1969). L'activité spécifique de l'ADN était de 1.000 cpm/µg. Le pourcentage d'ADN radioactif devenu soluble dans l'acide perchlorique au bout d'une heure d'incubation a servi à la mesure des activités enzymatiques. Sur 4 préparations de virus différentes, les mesures ont montré la présence des deux enzymes, la DNase acide et la DNase neutre (tableau XIII).

Tableau XIII

ACTIVITES DES DESOXYRIBONUCLEASES ACIDE ET NEUTRE DANS LES VIRIONS PURIFIES DES POXVIRUS

Origine des virions	µg d'ADN dégradé/mg de protéine virale/heure	
	DNase acide (pH 5,0)	DNase neutre (pH 7,8)
Amsacta	34[a] (15-40)	46,0 (37,5-40)
vaccine	1.996[b] (200-2.880)	904 (280-1.720)
tumeur Yaba	276[c] (201-412)	382 (210-518)

(a) moyenne d'au moins 3 déterminations. Les valeurs entre crochets représentent les valeurs extrêmes.
(b) d'après POGO et DALES (1969)
(c) d'après SCHWARTZ et DALES (1971).

Comme pour les DNases des virions de la vaccine ou de la tumeur Yaba, l'optimum d'activité de ces enzymes se situe à pH 5,0 et 7,8 respectivement et seul l'ADN dénaturé par chauffage à 100°C pendant 15 minutes est hydrolysé. A pH 9,0, l'hydrolyse de l'ADN est minimale, ce qui indique l'absence dans les virions de DNase alcaline. Le traitement des virions au NP-40 et au 2-mercaptoéthanol est nécessaire pour activer les DNases, preuve indirecte de la localisation de celles-ci dans le nucléoïde. L'activité relativement faible des DNases du poxvirus d'*Amsacta* comparées à celles des poxvirus de vertébrés est probablement due à une inactivation partielle des

enzymes au cours de la dissolution des inclusions dans le thioglycolate ou dans les étapes ultérieures de la purification. Nous avons en effet constaté qu'une suspension de virions soumise à l'action prolongée de thioglycolate de sodium 0,032 M, Na_2CO_3 0,08 M, pH 10,8 avait perdu toute activité DNasique.

3 - *ARN polymérase*

La présence d'une ARN polymérase dans les virions a été recherchée en incubant des nucléoïdes en présence de ribonucléotides non marqués et d'^{3}H-méthyl UTP, selon la technique de KATES et BEESON (1970). L'ARN synthétisé est précipité par l'acide trichloracétique et recueilli sur un filtre pour comptage de la radioactivité.

Dans les 4 préparations de virus utilisées précédemment pour caractériser les autres enzymes, nous n'avons pu mettre en évidence d'activité ARN polymérasique. Nous en avons conclu que cette enzyme devait exister dans les virions mais que son activité était perdue au cours de la purification. L'emploi d'une technique plus douce de préparation des virions a confirmé cette hypothèse. Si l'on abaisse le pH de la solution de thioglycolate à pH 8 par addition de tampon phosphate 2 M immédiatement après la dissolution des inclusions, les virions possèdent l'activité ARN polymérasique. Cette activité n'a pu être quantifiée faute de matériel viral en quantité suffisante.

4 - *Discussion*

La présence dans les virions de l'entomopoxvirus d'*Amsacta* des mêmes activités enzymatiques que celles mises en évidence chez les poxvirus de vertébrés apporte une preuve supplémentaire, s'ajoutant aux données morphologiques, morphogénétiques et chimiques, de la ressemblance de ce virus avec ceux du groupe des poxvirus. Nous pensons que ce critère enzymatique pourrait servir de complément aux critères morphologiques déjà établis, pour identifier les autres entomopoxvirus comme des poxvirus.

Nous verrons au chapitre V, à la lumière des travaux effec-

tués sur les poxvirus de vertébrés, la signification que l'on peut donner à ces activités enzymatiques et la période probable de leur apparition au cours du cycle de multiplication virale. La présence de ces enzymes, démontrée chez plusieurs poxvirus, apparaît d'ores et déjà comme un important critère d'homogénéité et d'originalité des virus de ce groupe.

CHAPITRE IV

COMPARAISON ENTRE LES ENTOMOPOXVIRUS

Pages

I - INTRODUCTION 105

II - LES ENTOMOPOXVIRUS DE COLEOPTERES 106

A - L'entomopoxvirus d'*Othnonius batesi* 106

B - L'entomopoxvirus de *Dermolepida albohirtum* 107

C - L'entomopoxvirus de *Demodena boranensis* 107

D - L'entomopoxvirus de *Phyllopertha horticola* 108

E - L'entomopoxvirus de *Figulus sublaevis* 108

F - L'entomopoxvirus de *Geotrupes silvaticus* 110

G - Discussion 110

III - LES ENTOMOPOXVIRUS DE LEPIDOPTERES 112

A - L'entomopoxvirus d'*Operophtera brumata* 112

B - L'entomopoxvirus d'*Acrobasis zelleri* 112

C - L'entomopoxvirus d'*Oreopsyche angustella* 113

D - L'entomopoxvirus de *Choristoneura biennis* 114

E - L'entomopoxvirus d'*Euxoa auxiliaris* 114

F - Discussion 115

Pages

IV - LES ENTOMOPOXVIRUS D'ORTHOPTERES 116

A - L'entomopoxvirus de *Melanoplus sanguinipes* 116

B - Discussion 117

V - LES ENTOMOPOXVIRUS DE DIPTERES 117

A - L'entomopoxvirus de *Camptochironomus tentans* 117

B - L'entomopoxvirus de *Chironomus luridus* 118

C - L'entomopoxvirus de *Chironomus attenuatus* 120

D - Discussion 120

VI - CONCLUSIONS 120

CHAPITRE IV

COMPARAISON ENTRE LES ENTOMOPOXVIRUS

I - INTRODUCTION

Après la découverte du premier entomopoxvirus chez le coléoptère *Melolontha melolontha* (VAGO, 1963), un grand nombre de virus semblables ont été décrits chez d'autres insectes. C'est ainsi qu'au cours de la dernière décennie, une quinzaine de cas de viroses à poxvirus ont été observés dans des populations naturelles de différentes espèces appartenant aux ordres des Lépidoptères, des Coléoptères, des Diptères et des Orthoptères. Les aires géographiques de répartition de ces insectes sont des plus variées puisqu'elles comprennent l'Europe, le continent Nord et Sud Américain, l'Australie, l'Inde et Madagascar.

En dehors des deux entomopoxvirus de *Melolontha* et d'*Amsacta* pour lesquels on possède un nombre relativement important de données exposées aux chapitres précédents, la plupart des autres virus de ce groupe sont encore peu connus, la description de certains d'entre eux n'étant pas publiée. Les données à leur sujet sont donc relativement peu nombreuses et concernent essentiellement la morphologie des virions et celle des inclusions qui leur sont associées. Leur étude comparée, que nous présentons dans ce chapitre, repose donc essentiellement sur ces critères. Pour des raisons de commodité, nous avons réuni les différents entomopoxvirus d'après les groupes d'insectes qu'ils parasitent, sans présumer de la validité d'une telle classification en ce qui concerne les virus eux-mêmes.

II - LES ENTOMOPOXVIRUS DE COLEOPTERES

A - L'entomopoxvirus d'*Othnonius batesi*

La virose à entomopoxvirus décrite par GOODWIN et FILSHIE (1969) chez la larve du scarabéide d'Australie *Othnonius batesi* présente de nombreuses analogies avec celle de *Melolontha*, tant par les inclusions qu'elle engendre que par la morphologie de l'agent causal. Le cytoplasme des cellules adipeuses est le siège principal de la multiplication virale qui a lieu occasionnellement dans les cellules de l'épiderme également.

Les inclusions fusiformes dont la taille atteint 10 µm dans leur grand axe sont légèrement plus renflées que chez *Melolontha*. En sections transversales, elles présentent des contours anguleux suggérant la présence d'arêtes longitudinales.

Les inclusions contenant les virions ("sphéroïde" des auteurs) sont de forme à peine ovale, leur diamètre moyen se situant entre 6 et 7 µm. On en compte plusieurs dizaines par cellule. La disposition des virions en travées radiaires à l'intérieur de l'inclusion et la présence d'une couche périphérique dépourvue de virions rappellent l'organisation des sphérules de l'entomopoxvirus de *Melolontha*.

Les virions sont de forme ovale et mesurent 460-480 nm de long sur 260-270 nm de large. Leur structure, étudiée sur coupes ultra-fines d'inclusions, est tout à fait comparable à celle des virions de l'entomopoxvirus de *Melolontha*. Elle comprend une enveloppe ornée de protubérances sphériques d'environ 200 Å de diamètre, un nucléoïde unilatéralement concave délimité par une coque à trois feuillets de 120 Å d'épaisseur totale et un corps latéral unique logé dans la concavité du nucléoïde. Ce dernier, de forte opacité aux électrons, renferme une structure filamenteuse moins dense d'environ 300 Å de diamètre repliée sur elle-même. Entourant le virion, une couche diffuse de 300 Å d'épaisseur et de faible densité aux électrons sépare la surface bosselée du virion de la protéine cristallisée.

GOODWIN et FILSHIE ont également observé dans le cytoplasme

des particules immatures sphériques se développant au contact de masses virоplasmiques denses. Ces formes de 250 nm de diamètre sont délimitées par une membrane trilamellaire formée de deux feuillets denses d'environ 75 Å d'épaisseur séparés par un feuillet clair d'environ 50 Å. Les auteurs considèrent que les particules immatures accumulées à la périphérie des sphéroïdes acquièrent un manteau à "sous-unités" ("subunit coat") et que leur maturation se poursuit dans l'inclusion.

B - L'entomopoxvirus de *Dermolepida albohirtum*

Ce virus mentionné par GOODWIN et FILSHIE (1969) dans leur article sur l'entomopoxvirus d'*Othnonius batesi* n'a fait à ce jour, à notre connaissance, l'objet d'aucune description. Il est surtout intéressant par le fait qu'il n'induit apparemment pas la synthèse d'inclusions de type fuseaux dans les cellules de son hôte.

C - L'entomopoxvirus de *Demodena boranensis*

La "virose à fuseaux" décrite par VAGO et collaborateurs (1968) chez la larve du scarabéide d'Argentine *Demodena boranensis* est également très proche de celle de *Melolontha*. Les inclusions de type fuseaux sont de forme losangique et peuvent atteindre 25 µm de long. Les inclusions de type sphérules sont ovoïdes et ne dépassent pas 10-12 µm dans leur plus grande dimension (Pl. XLV, Fig. 132). Outre les cellules adipeuses, le virus se multiplie également dans les cellules sanguines et épithéliales. On note fréquemment sur les coupes histologiques une grosse ou plusieurs petites inclusions losangiques étroitement accolées à une, rarement deux inclusions ovoïdes. Sur coupes ultra-fines observées à faible grandissement, on constate que ces arrangements résultent de la réunion de deux ou plusieurs inclusions par une substance amorphe de densité aux électrons plus forte que le cytoplasme environnant formant un ciment (Pl. XLV, Fig. 134).

L'agent de la maladie est de forme ovoïde et ses dimensions moyennes sont de 420 nm x 230 nm. Son architecture telle qu'elle apparaît sur coupes ultra-fines d'inclusions ovoïdes ne le différencie pas des autres

entomopoxvirus de coléoptères. Les trois constituants de base : enveloppe festonnée, un seul corps latéral et un nucléoïde unilatéralement concave renfermant une structure filamenteuse sont présents (Pl. XLV, Fig. 133).

D - L'entomopoxvirus de *Phyllopertha horticola*

La maladie décrite par VAGO et collaborateurs (1969) chez des larves du rutelide *Phyllopertha horticola* récoltées dans le Jura présente des caractéristiques semblables à celles que nous venons de décrire ci-dessus.

Les inclusions de type fuseaux ont des contours nettement polygonaux en coupes semi-fines de matériel inclus dans l'épon (Pl. XLVI, Fig. 135). Leur taille ne dépasse pas 20 µm dans leur plus grande dimension. Les inclusions de type sphérules sont allongées et ont la forme de parallélipipèdes à angles arrondis. Elles peuvent atteindre 25 µm de long sur 15 µm de large. Le groupement de plusieurs fuseaux autour d'une sphérule formant des îlots cytoplasmiques à contours ovales est fréquent et rappelle les arrangements observés chez *Demodena*.

Les virions inclus dans les "sphérules" ont une forme ovale et mesurent 400 nm x 240 nm. Leur structure, illustrée sur la figure 136 (Pl. XLVI) est comparable à celle des autres entomopoxvirus de coléoptères. Les virions inclus à la périphérie des inclusions possèdent un nucléoïde dont la substance fondamentale n'est pas différenciée, à l'image de ceux que nous avons observés chez l'entomopoxvirus de *Melolontha* (Pl. XLVI, Fig. 137).

D'après VAGO et collaborateurs (1969), la morphogénèse virale a lieu dans les mêmes îlots cytoplasmiques que ceux où l'on trouve les groupements d'inclusions.

E - L'entomopoxvirus de *Figulus sublaevis*

Ce virus, décrit en 1968 par VAGO et collaborateurs chez la larve de lucanide de Madagascar *Figulus sublaevis* se multiplie essentielle-

ment dans le tissu adipeux, plus rarement dans les cellules hypodermiques et l'épithélium intestinal. Si l'on retrouve dans les cellules infectées les deux types d'inclusions précédemment décrites chez les autres entomopoxvirus de coléoptères, leur répartition dans le cytoplasme et leur morphologie sont tout à fait originales. Sur une coupe semi-fine colorée au bleu de toluidine, on distingue nettement dans le tissu adipeux des plages ne contenant que des inclusions de type fuseaux et d'autres plages dans lesquelles on ne reconnaît que des inclusions de type sphérules (Pl. XLVII, Fig. 138). Cette ségrégation des inclusions assez bien respectée dans tout le cytoplasme apparaît nettement sur une coupe ultra-fine observée à faible grandissement (Pl. XLVII, Fig. 139).

Les sections des inclusions de type fuseaux sont souvent en fer de lance. Ces inclusions sont très abondantes dans une même cellule et leur taille dépasse rarement 4 à 5 µm. A fort grandissement on note une membrane de type réticulum endoplasmique les entourant et délimitant également les plages à fuseaux (Pl. XLVII, Fig. 140).

Les inclusions de type sphérules sont également très nombreuses et de petite taille (1 à 5 µ), leur forme est des plus variée mais beaucoup ont des contours ovales (Pl. XLVII, Fig. 139). Leur cohésion semble relativement faible si l'on en juge par les fentes observées au sein de certaines d'entre elles. Corrélativement à leur petite taille, ces inclusions ne renferment qu'un petit nombre de virions, parfois un seul visible sur une coupe. Il ne semble pas y avoir d'organisation particulière des virions dans l'inclusion, comme c'est le cas avec les sphérules de grand diamètre des autres entomopoxvirus de coléoptères. A la périphérie de ces inclusions et plus généralement au sein des plages à "sphérules" on observe, à fort grandissement, des filaments opaques en dents de scie qui pourraient correspondre à des molécules de protéines participant à l'élaboration des cristaux (Pl. XLVII, Fig. 141).

La structure des virions observés en coloration négative est la même que celle de l'entomopoxvirus de *Melolontha*. On distingue en particulier :

- des particules ovoïdes de 370 x 250 nm non pénétrées par l'APT à la sur-

face desquelles on reconnaît de nombreuses protubérances sphériques d'environ 160 Å de diamètre donnant au virion l'aspect d'une mûre (Pl. XLVIII, Fig. 142) ;

- des particules à l'intérieur desquelles l'APT a pénétré, révélant un nucléoïde unilatéralement concave et un seul corps latéral (Pl. XLVIII, Fig. 143). On retrouve cette architecture sur coupes ultra-fines d'inclusions (Pl. XLVIII, Fig. 144 et 145).

La figure 146 (Pl. XLIX) illustre une aire de morphogénèse située à proximité du noyau dans une cellule adipeuse de *Figulus*. On y reconnaît de nombreuses formes immatures sphériques à différents stades de différenciation, certaines en voie de formation par encapsulation de matériel viroplasmique. De nombreux éléments vésiculaires semblables à ceux décrits précédemment chez *Melolontha* sont présents au voisinage immédiat des formes immatures. De même on observe, à côté des viroplasmes, des masses de densité aux électrons plus faible.

F - L'entomopoxvirus de *Geotrupes silvaticus*

Il s'agit d'un virus découvert récemment en Pologne, dans les populations naturelles de scarabéïde *Geotrupes silvaticus* (LIPA, 1972). Le virus se multiplie dans le tissu adipeux avec production d'inclusions fusiformes et ovoïdes. Ces dernières renferment des virions de forme ovoïde de 370-420 x 260-290 nm, ressemblant aux virions de l'entomopoxvirus de *Melolontha*.

G - Discussion

Les différentes maladies à entomopoxvirus connues à ce jour chez les coléoptères et que nous venons de passer en revue montrent une certaine unité tant par la morphologie de l'agent causal que par les inclusions qui les accompagnent.

Si l'on fait abstraction du cas de *Dermolepida albohirtum*

pour lequel l'absence d'inclusions type fuseaux nous semble devoir être confirmée, la présence simultanée dans les cellules infectées, essentiellement les cellules adipeuses, des deux types d'inclusions est la règle générale dans ce groupe. La taille, le nombre et la forme de ces inclusions (particulièrement celles de type fuseaux) varient dans de grandes proportions d'un insecte à l'autre. Il n'est pas possible actuellement d'apprécier la signification de ces variations, en particulier nous ne savons pas si elles reflètent des propriétés intrinsèques des souches virales ou celles des cellules hôtes. Comme nous l'avons évoqué dans la discussion sur les inclusions de l'entomopoxvirus de *Melolontha* (voir chapitre II, section II D), nous penchons plutôt pour la première hypothèse, surtout en ce qui concerne les inclusions de type sphérules. Malheureusement, aucun des entomopoxvirus de coléoptères décrits ci-dessus n'a pu être multiplié expérimentalement en laboratoire à ce jour, soit faute de matériel infectieux en quantité suffisante, soit faute d'avoir trouvé un hôte sensible de remplacement. Lorsque de telles infections seront possibles, différentes expérimentations pourront être entreprises pour répondre à cette importante question.

En ce qui concerne les virions eux-mêmes, leur architecture correspond au schéma donné pour celui de l'entomopoxvirus de *Melolontha* (voir Pl. XXI, Fig. 63). Ils sont tous de forme ovoïde et de grande taille (420 nm x 250 nm en moyenne). Leur enveloppe est ornée de protubérances sphériques donnant aux virions un aspect mûriforme en coloration négative et un contour festonné en coupes ultra-fines. Tous possèdent un nucléoïde réniforme délimité par une coque tripartite et un seul corps latéral logé dans sa concavité. La structure filamenteuse de faible opacité aux électrons est toujours présente au sein de la substance dense renfermée dans le nucléoïde. Enfin, les données fragmentaires que nous possédons sur l'ultrastructure des particules immatures semblent indiquer que la morphogénèse s'effectue chez ces virus selon un schéma comparable à celui que nous avons exposé précédemment pour l'entomopoxvirus de *Melolontha* (voir chapitre II, section IV B).

III - LES ENTOMOPOXVIRUS DE LEPIDOPTERES

A - L'entomopoxvirus d'*Operophtera brumata*

A la suite d'observations de mortalité abondante entre 1957 et 1960 dans les populations d'*Operophtera brumata* inféodées aux forêts de chênes des rives de la Morava (Tchécoslovaquie), WEISER et VAGO (1966) ont décrit un état pathologique chez ce lépidoptère caractérisé par une hypertrophie des segments abdominaux et un blanchissement des larves. Leur mobilité diminue progressivement et elles finissent par mourir sur les feuilles, le corps dilaté et rigide.

Sur coupes histologiques, les cellules adipeuses apparaissent hypertrophiées et bourrées d'inclusions cytoplasmiques de deux types. Les unes, de forme ovale, mesurent en moyenne 3,5 x 2 µ, les autres, fusiformes, peuvent atteindre 14 µ de long sur 5 µ de large. Ces formes géantes sont rares, la plupart des fuseaux ayant une taille inférieure à celle des inclusions ovoïdes. Outre ces inclusions, les auteurs ont observé dans le cytoplasme de longs filaments entrelacés de 0,5 à 1 µ de large sur 20 à 50 µ de long.

Sur coupes ultra-fines de cellules adipeuses, les inclusions fusiformes sont uniformément opaques aux électrons tandis que l'on observe, dans la substance des inclusions ovoïdes, des granules ovales de 370 x 250 mm correspondant à des virions inclus (WEISER et VAGO, 1966 ; WEISER et ZIZKA, 1967). La qualité médiocre des coupes ultra-fines due à la conservation pendant plusieurs années du matériel à l'état sec ne permet pas de préciser la structure des virions inclus. Il semble toutefois que le nucléoïde, comme celui des virions de l'entomopoxvirus d'*Amsacta*, soit cylindrique et flanqué de deux corps latéraux.

B - L'entomopoxvirus d'*Acrobasis zelleri*

Dans leur description de la virose à entomopoxvirus d'*Operophtera brumata* (voir ci-dessus), WEISER et VAGO (1966) mentionnent qu'ils ont

observé le même type de maladie chez *Acrobasis zelleri*, lépidoptère vivant dans le même biotope.

C - L'entomopoxvirus d'*Oreopsyche angustella*

MEYNADIER et collaborateurs (1968) ont décrit sous le nom de "virose à inclusions ovoïdes" une maladie chez *Oreopsyche angustella* due à un entomopoxvirus. Les larves provenaient des hauts plateaux de l'Ardèche où ce lépidoptère est inféodé aux prairies à graminées. Les symptômes, limités à un léger gonflement abdominal, traduisent un développement anormal du tissu adipeux, visible à la dissection. Sur coupes semi-fines, on reconnaît (Pl. L, Fig. 147) dans ce tissu de très nombreuses inclusions cytoplasmiques de forme ovoïde mesurant de 3 à 10 µm de long sur 2 à 7 µm de large. Plus rarement, on observe des inclusions fusiformes de 2 à 10 µm de long sur 1,5 à 7 µm de large. Ces dernières sont généralement groupées en îlots isolés dans ces cellules ne contenant apparemment pas d'inclusions ovoïdes. Des filaments semblables à ceux décrits chez *O. brumata* parcourent les espaces situés entre les inclusions. Outre le tissu adipeux, les auteurs signalent la présence de ces inclusions dans les hémocytes, les cellules périphériques de l'intestin et de la chaîne nerveuse.

Les virions observés sur coupes ultra-fines d'inclusions ovoïdes sont de forme ovale, mesurant environ 360 x 260 nm. On distingue nettement à la périphérie du virion une enveloppe festonnée correspondant à la section des structures globulaires visibles sur des virions coupés tangentiellement à leur surface (Pl. LI, Fig. 150). Comme chez la plupart des entomopoxvirus observés dans ces conditions, l'enveloppe n'est pas en contact avec la trame cristalline de l'inclusion, un hâlo clair aux électrons les séparant. Le nucléoïde est de forme cylindrique ou légèrement biconcave et renferme une substance dense et une structure filamenteuse plus claire. Deux corps latéraux discrets sont logés entre l'enveloppe externe et la coque tripartite du nucléoïde.

La trame cristalline des inclusions ovoïdes est particulièrement bien mise en évidence sur la figure 151 (Pl. LI).

Au microscope électronique, la structure des filaments observés sur coupes semi-fines se résoud en un réseau de fibrilles plus ou moins enchevêtrées (Pl. L, Fig. 148). On trouve également à la périphérie des inclusions des empilements réguliers de structures en chaînettes d'environ 400 Å d'épaisseur (Pl. L, Fig. 149). Ces deux types de structures ont été également observés dans les cellules d'*Estigmene acrea* infectées par l'entomopoxvirus d'*Amsacta* (GRANADOS et ROBERTS, 1970).

La morphogénèse virale s'effectue apparemment selon un processus semblable à celui décrit pour les autres entomopoxvirus. En particulier, l'enveloppe des formes immatures se différencie à la périphérie de masses viroplasmiques denses dont elles englobent le contenu et on retrouve dans le cytoplasme avoisinant des particules sphériques à différents stades de maturation.

D - L'entomopoxvirus de *Choristoneura biennis*

La maladie décrite par BIRD et collaborateurs (1971) chez une tordeuse d'Amérique du nord, *Choristoneura biennis*, se caractérise par la présence d'inclusions ovoïdes de 3 à 4 µm de long sur 2 à 3,2 µm de large dans le cytoplasme des cellules adipeuses et de l'intestin moyen. Les virions contenus dans ces inclusions sont de forme ovale et mesurent environ 400 x 300 nm. Leur structure semble peu différente de celles des virions de l'entomopoxvirus d'*Amsacta*. Comme chez *Estigmene acrea*, il ne semble pas y avoir d'inclusions de type fuseaux.

E - L'entomopoxvirus d'*Euxoa auxiliaris*

La virose à entomopoxvirus décrite récemment aux Etats-Unis par SUTTER (1972) chez la larve du lépidoptère *Euxoa auxiliaris* présente toutes les caractéristiques essentielles de celles connues chez *Amsacta*. Les inclusions de type sphérules, seules présentes, sont de forme ovale, mesurant en moyenne 3,7 x 4,7 µm. Abondantes dans les cellules adipeuses, ces inclusions se rencontrent également dans les cellules péritrachéales et musculaires de l'intestin. Les virions qu'elles renferment possèdent une archi-

tecture tout à fait semblable à celle de l'entomopoxvirus d'*Amsacta*, bien que leur taille, 165 x 260 nm, soit nettement plus petite. La morphogénèse virale à partir de viroplasmes et la présence dans les cellules d'un réseau de fibrilles cytoplasmiques sont autant de propriétés communes aux deux virus.

F - Discussion

Les informations essentielles présentées ci-dessus que nous possédons sur les entomopoxvirus de lépidoptères permettent de définir les principales caractéristiques de ces virus et leur originalité par rapport aux autres virus de ce groupe.

Sur le plan de l'histopathologie, le tissu adipeux est le siège principal de la multiplication virale et, par conséquent, des lésions les plus évidentes.

La sensibilité des cellules à l'infection virale ne semble toutefois pas limitée à ce seul tissu, plusieurs auteurs signalant une attaque d'autres types cellulaires. La présence d'un réseau de fibrilles cytoplasmiques dans les cellules infectées semble la règle.

Les inclusions de type sphérules sont généralement de petite taille (en moyenne < à 10 nm de long), leur forme est nettement ovoïde et elles sont toujours en grand nombre dans une même cellule. Les inclusions de type fuseaux ne se rencontrent que chez certaines espèces de lépidoptères et quand elles sont présentes, leur nombre est toujours plus faible que celui des inclusions ovoïdes. Ces deux caractéristiques différencient nettement les entomopoxvirus de lépidoptères de ceux de coléoptères chez lesquels les deux types d'inclusions cohabitent généralement, les inclusions de type fuseaux étant en nombre égal ou supérieur à celui des inclusions de type sphérules. Il est toutefois trop tôt pour dire si ces différences traduisent certaines propriétés spécifiques des entomopoxvirus de lépidoptères ou des insectes hôtes eux-mêmes. Rappelons, à cet effet (voir la discussion sur les fuseaux associés à l'entomopoxvirus de *Melolontha*, chapitre II, section II C), que dans certaines polyédries nucléaires de lépidoptères (Baculovirus), on a

observé des inclusions fusiformes cytoplasmiques associées à la multiplication du virus.

Les virions des entomopoxvirus de lépidoptères sont de forme ovale et leur enveloppe présente l'ornementation typique des entomopoxvirus de coléoptères. Leur taille est toutefois plus faible (350 x 250 nm en moyenne) et leur nucléoïde cylindrique ou légèrement biconcave est flanqué de deux corps latéraux discrets.

La morphogénèse virale, là où elle a été observée, semble se dérouler selon un schéma comparable à celui décrit chez les entomopoxvirus de coléoptères.

IV - LES ENTOMOPOXVIRUS D'ORTHOPTERES

A - L'entomopoxvirus de *Melanoplus sanguinipes*

D'abord décrit comme un virus de polyédrie nucléaire (HENRY et JUTILA, 1966), l'agent étiologique de cette maladie du criquet de l'Arizona, *Melanoplus sanguinipes*, s'est avéré appartenir au groupe des entomopoxvirus (HENRY et collaborateurs, 1969).

La multiplication du virus a lieu dans le tissu adipeux dont le développement anormal produit une hypertrophie des larves avec dilatation des membranes intersegmentaires. L'examen de coupes histologiques révèle un grand nombre d'inclusions cytoplasmiques ovales ou cuboïdales de 1,5 x 10,5 µm dans ce tissu. Sur coupes ultra-fines observées au microscope électronique, on reconnaît à l'intérieur des inclusions de nombreux virions de forme ovale mesurant 320 x 250 nm en moyenne. Le virion possède un nucléoïde cylindrique ou biconcave selon le plan de coupe. L'acide nucléique viral est un ADN.

La formation de particules immatures s'effectue à la périphérie de plages viroplasmiques denses à structure granulaire délimitées par une membrane. Les particules sphériques se détachent des viroplasmes et évo-

luent en formes matures par différenciation de leur contenu. Les auteurs ont également décrit des plages moins denses que les viroplasmes contenant un matériel à la fois fibrillaire et granulaire. Ces plages, nombreuses 8 jours après l'infection, évolueraient en plages viroplasmiques par condensation de matériel et différenciation d'une membrane périphérique à partir des fibrilles qu'elles renferment.

D'après les auteurs, la multiplication virale et la formation d'inclusions ont lieu aussi bien dans le noyau que dans le cytoplasme.

B - Discussion

Les caractéristiques morphologiques du virion et des inclusions rapprochent ce virus des entomopoxvirus de lépidoptères. Son cycle de multiplication est également comparable à celui décrit chez ces derniers. Toutefois, l'observation par HENRY et collaborateurs de formes immatures et d'inclusions de type sphérules intranucléaires constitue une différence fondamentale par rapport aux autres entomopoxvirus. Nous pensons que ce résultat doit être confirmé, et une réponse positive confèrerait à ce virus une grande originalité puisqu'à notre connaissance, un seul cas inexpliqué de présence de virions dans le noyau de la cellule hôte est connu à ce jour chez les poxvirus de vertébrés (ARHELGER et RANDALL, 1964).

Bien que l'entomopoxvirus de *Melanoplus sanguinipes* soit le seul virus de ce type chez les orthoptères qui ait fait l'objet de publications, des virus semblables ont été trouvés dans des populations d'autres acridiens en Amérique du Nord (HENRY, communication personnelle).

V - LES ENTOMOPOXVIRUS DE DIPTERES

A - L'entomopoxvirus de *Camptochironomus tentans*

Dans un travail ancien, WEISER (1949) a décrit une maladie chez la larve du chironome *Camptochironomus tentans* caractérisée par la pré-

sence d'inclusions ovales de 2 à 15 µm de long sur 2 à 10 µm de large dans le cytoplasme des cellules adipeuses. En plus de ces inclusions, il notait un grand nombre de corpuscules globulaires cytoplasmiques de 0,3 à 0,5 µm de diamètre. Après traitement à l'acide chlorhydrique 0,1 M, il reconnaissait dans les inclusions des corpuscules semblables à ceux du cytoplasme environnant. Des affinités des inclusions pour certains colorants et de leurs propriétés physico-chimiques, cet auteur avait déduit à l'époque qu'il s'agissait d'une nouvelle maladie à virus d'insecte et concluait : "A côté de ces maladies des noyaux (polyédries nucléaires) se range notre nouvelle cristallose, comme une maladie attaquant le cytoplasme des cellules".

Reprenant ce matériel inclus dans la paraffine 26 ans auparavant et l'incluant dans le Vestopal pour la microscopie électronique, WEISER (1969) a observé la structure des virions et constaté qu'ils s'apparentaient aux groupes des poxvirus. La forme du virion est celle d'un parallélipipède rectangle à angles et arêtes arrondis mesurant 200-250 x 270-300 x 130-180 nm. A l'intérieur d'une enveloppe de 150 à 200 Å d'épaisseur, un corps central biconcave contient une substance dense aux électrons.

Des formes immatures ovales (300 x 350 nm) limitées par une enveloppe de 30 à 40 nm d'épaisseur et renfermant une substance granulaire ont également été observées par l'auteur. C'est à partir de ces formes que se différencieraient les virions.

B - L'entomopoxvirus de *Chironomus luridus*

GOTZ et collaborateurs (1969) ont décrit chez la larve du chironome *Chironomus luridus* une maladie caractérisée par l'apparition de taches blanchâtres sur tout le corps. Ces taches proviennent de l'accumulation, dans le tissu adipeux essentiellement, d'inclusions de forme ovale ou polygonale mesurant entre 4 et 7 µm. Sur coupes histologiques, on retrouve ces inclusions dans d'autres tissus : l'hypoderme, les hémocytes, les disques imaginaux et les cellules conjonctives d'emballage.

La forme des virions inclus ou libres dans le cytoplasme est celle d'un parallélipipède rectangle à arêtes émoussées mesurant en moyenne

320 x 230 x 110 nm (GÖTZ et al., 1969 ; HUGER et al., 1971). Sur coupes ultra-fines de virions, on distingue les trois constituants typiques des poxvirus :

- un nucléoïde biconcave en sections longitudinales et rectangulaire en sections horizontales, délimité par une structure membranaire. L'intérieur du nucléoïde contient un matériel à structure fibrillaire dense aux électrons ;

- deux corps latéraux bien développés, d'opacité moyenne aux électrons, logés dans les concavités du nucléoïde ;

- une enveloppe à surface bosselée.

La dissolution par la soude 0,1 M des inclusions permet d'observer, après coloration à l'APT, des virions fortement dégradés présentant un nucléoïde rectangulaire duquel sort parfois une structure en bâtonnet.

Les formes immatures de virus se développent au sein de "stromas virogènes" composés de matériel fibrillaire et de grains de 30 à 80 nm de diamètre. Ce sont d'abord des particules sphériques de 275 nm de diamètre renfermant du matériel viroplasmique. Elles sont délimitées par une enveloppe d'environ 150 Å qui se résoud en une membrane de type unitaire et à laquelle est accolée une couche externe portant des protubérances. Par différentes étapes de maturation, les composants structuraux des particules virales se différencient à partir du matériel contenu dans les sphères.

L'incorporation des virions dans les inclusions s'effectue selon un processus semblable à celui décrit chez les autres entomopoxvirus. Dans les inclusions matures, la partie périphérique dépourvue de virions est délimitée par une structure de type membranaire que l'on peut observer après dissolution des inclusions dans la soude. Par coloration histochimique, les auteurs précédemment cités ont caractérisé l'acide nucléique viral comme étant un ADN.

C - L'entomopoxvirus de *Chironomus attenuatus*

STOLTZ et SUMMERS (1972) ont récemment observé chez la larve d'un diptère des Etats-Unis, *Chironomus attenuatus*, une maladie ressemblant beaucoup à celle décrite en Europe chez *Chironomus luridus* (voir ci-dessus).

Il semble toutefois que seuls les hémocytes soient atteints et, à un stade avancé de l'infection, ils renferment de nombreuses inclusions pouvant atteindre 6 µm de diamètre. Les virions contenus dans ces inclusions ont une forme cuboïdale et mesurent environ 250 x 250 x 110 nm. Ils possèdent un nucléoïde biconcave et deux corps latéraux.

L'enveloppe des formes immatures est constituée d'une membrane unitaire recouverte de petites sous-unités spiculaires. Ce caractère, comme la morphologie des formes matures, rapproche ce virus des poxvirus de vertébrés (voir chapitre suivant).

D - Discussion

Si sur le plan de l'histopathologie les maladies à entomopoxvirus de diptères ne présentent pas de grande originalité, par contre, la morphologie des virions est nettement différente de celle des autres entomopoxvirus. Les virions sont en effet nettement plus petits (320 nm dans leur plus grande dimension), leur forme est celle d'un parallélipipède à contours émoussés et leur nucléoïde est franchement biconcave. Par ces caractères, les entomopoxvirus de diptères semblent plus proches des poxvirus de vertébrés.

Une autre maladie de ce type a été reconnue récemment chez une anophèle du Panama, *Anophales albimanus* (VAGO, 1971).

VI - CONCLUSIONS

De l'ensemble des données sur les entomopoxvirus présentées dans ce chapitre et résumées dans les tableaux XIV et XV, nous dégagerons

les points essentiels suivants :

Selon le groupe d'insectes considéré, et au sein d'un même groupe suivant l'espèce, les maladies à entomopoxvirus présentent une grande diversité tant par la nature des tissus atteints que par la forme et les types d'inclusions produits. En ce qui concerne le premier point, il est à noter que le tissu adipeux, particulièrement riche en produits de réserves chez les larves d'insectes, est le site principal de multiplications du virus.

La formation d'inclusions renfermant des virions (inclusions de type sphérules) est la règle chez tous les entomopoxvirus connus à ce jour. La taille de ces inclusions et, par voie de conséquence, leur nombre dans une même cellule, ainsi que le nombre de virions qu'elles renferment, varient dans de larges proportions d'une souche à l'autre. Ces inclusions, ainsi que nous le verrons au chapitre suivant, sont l'équivalent des inclusions de type A des poxvirus de vertébrés.

Parallèlement aux inclusions de type sphérules, d'autres ne renfermant pas de virions (inclusions de type fuseaux) sont également produites chez certains insectes. La diversité de forme et de taille de ces inclusions est également très grande d'un cas à l'autre. Le fait qu'elles ne soient pas toujours présentes indique qu'elles ne jouent pas un rôle essentiel dans la multiplication virale. La signification de ces inclusions est encore obscure et des expériences doivent être mises au point pour élucider le problème de la nature de l'information génétique (virale ou cellulaire) à l'origine de la synthèse de leurs protéines.

Bien qu'il soit encore prématuré de tirer des conclusions définitives des données sur la morphologie des virions, il semble que l'on puisse grouper les entomopoxvirus en trois types distincts :

- Le type entomopoxvirus de *Melolontha* auquel se rattachent les autres poxvirus de coléoptères. Les virions de ce type sont les plus gros connus, leur forme est franchement ovale et leur nucléoïde unilatéralement concave. Ils ne possèdent qu'un corps latéral.

- Le type entomopoxvirus d'*Amsacta* auquel se rattachent les autres poxvirus de lépidoptères et celui de l'orthoptère *Melanoplus sanguinipes*. Les virions sont plus petits, de forme ovale et leur nucléoïde est cylindrique ou légèrement biconcave. Ils possèdent deux corps latéraux discrets.

- Le type entomopoxvirus de diptères représenté par les virus des chironomes. Les virions sont nettement plus petits et leurs contours plus anguleux que chez les autres entomopoxvirus. Ils possèdent un nucléoïde franchement biconcave et deux corps latéraux bien développés. Par leur taille et leur architecture, ces virus sont de tous les entomopoxvirus ceux qui ressemblent le plus aux poxvirus de vertébrés.

Ce groupement des entomopoxvirus en trois types repose, nous l'avons dit, uniquement sur des critères morphologiques et sa valeur est, de ce fait, toute relative. L'isolement de nouvelles souches et l'approfondissement de nos connaissances sur les souches actuellement décrites nous amèneront à confirmer ou à modifier nos conceptions actuelles. La comparaison sérologique des différentes souches apparaît, en particulier, indispensable à tout essai de classification des virus au sein de ce groupe.

Enfin, nous retiendrons que la morphogénèse virale, là où elle a pu être observée, s'effectue chez tous les entomopoxvirus selon un processus semblable.

Tableau XIII

CARACTERISTIQUES MORPHOLOGIQUES DES VIRIONS DES ENTOMOPOXVIRUS

Hôte	Dimension (nm) et forme	Aspect de la surface	Nucléoïde en section longitudinale	Corps latéraux	Acide nucléique
COLEOPTERES :					
Melolontha melolontha (réf. 1, 2, 3, 4, 5)	400 x 250 ovoïde	aspect de mûre, éléments globuleux de 220 Å de diamètre sans disposition régulière	unilatéralement concave, contient un filament de 200 Å de diamètre (4 à 5 éléments)	un seul corps lenticulaire	ADN
Demodena boranensis (réf. 6)	420 x 230 ovoïde	aspect de mûre, éléments globuleux sans disposition régulière	unilatéralement concave, contient un filament	un seul corps lenticulaire	
Othnonius batesi (réf. 7)	470 x 265 ovoïde	aspect de mûre, éléments globuleux de 220 Å de diamètre sans disposition régulière	unilatéralement concave, contient un filament de 300 Å de diamètre (3 éléments)	un seul corps lenticulaire	
Dermolepida albohirtum (réf. 7)					
Figulus sublaevis (réf. 8)	370 x 250 ovoïde	aspect de mûre, éléments globuleux de 160 Å de diamètre sans disposition régulière	unilatéralement concave, contient un filament	un seul corps lenticulaire	
Phyllopertha horticola (réf. 9)	400 x 240 ovoïde	aspect de mûre, éléments globuleux sans disposition régulière	unilatéralement concave, contient un filament	un seul corps lenticulaire	
Geotrupes silvaticus (réf. 10)	400 x 275 ovoïde	aspect de mûre	unilatéralement concave	un seul corps lenticulaire	

LEPIDOPTERES :					
Amsacta moorei adapté sur *Estigmene acrea* (réf. 11 et 12)	350 x 250 ovoïde	aspect de mûre, éléments globuleux de 400 Å de diamètre sans disposition régulière	rectangulaire, contient un filament de 300 Å de diamètre (1 à 5 éléments)	deux corps discrets	ADN
Oreopsyche angustella (réf. 13)	360 x 260 ovoïde	aspect de mûre, éléments globuleux sans disposition régulière	rectangulaire ou légèrement biconcave	deux corps discrets	
Operophtera brumata (réf. 14)	370 x 250 ovoïde				
Acrobasis zelleri (réf. 14)					
Choristoneura biennis (réf. 15)	400 x 300 ovoïde	aspect de mûre	rectangulaire	deux corps discrets	
Euxoa auxiliaris (réf. 16)	165 x 260 ovoïde	aspect de mûre	rectangulaire, contient un filament (jusqu'à 6 éléments)	deux corps discrets	
ORTHOPTERES :					
Melanoplus sanguinipes (réf. 17)	320 x 250 ovoïde		rectangulaire ou légèrement biconcave	deux corps discrets	ADN
DIPTERES :					
Chironomus luridus (réf. 18 et 19)	320 x 230 x 110 cuboïde		franchement biconcave, contient un filament	deux corps développés	ADN
Camptochironomus tentans (réf. 20)	280 x 250 x 140 cuboïde		franchement biconcave	deux corps développés	
Chironomus attenuatus (réf. 21)	250 x 250 x 110 cuboïde		franchement biconcave	deux corps développés	

Tableau XIII

REFERENCES :

(1) - VAGO, C. (1963). J. Insect Pathol., 5, 275-276

(2) - VAGO, C., CROISSANT, O. (1964). Entomophaga, 9, 207-210.

(3) - BERGOIN, M., DEVAUCHELLE, G., DUTHOIT, J.L., VAGO, C. (1968). C.R. Acad. Sci. Paris, D 266, 2126-2128.

(4) - BERGOIN, M., SCALLA, R., DUTHOIT, J.L., VAGO, C. (1967). Proc. Coll. Insect Pathol. micr. Control., Wageningen, 63-68.

(5) - BERGOIN, M., VEYRUNES, J.C., VAGO, C. (1969). C.R. Acad. Sci. Paris, D 269, 1464-1466.

(6) - VAGO, C., AMARGIER, A., HURPIN, B., MEYNADIER, G., DUTHOIT, J.L. (1968). Entomophaga, 13, 373-375.

(7) - GOODWIN, R.H., FILSHIE, B.K. (1969). J. Invertebr. Pathol., 13, 317-329.

(8) - VAGO, C., MONSARRAT, P., DUTHOIT, J.L., AMARGIER, A., MEYNADIER, G., VAN WAEREBEKE, D. (1968). C.R. Acad. Sci. Paris, D 266, 1621-1623.

(9) - VAGO, C., ROBERT, P., AMARGIER, A., DUTHOIT, J.L. (1969). Mikroskopie, 25, 378-386.

(10) - LIPA, J.J., BARTKOWSKI, J. (1972). J.Invertebr. Pathol., 20, 218-219.

(11) - GRANADOS, R.R., ROBERTS, D.W. (1970). Virology, 40, 230-243.

(12) - ROBERTS, D.W., BERGOIN, M. (1971). Proc. IVth. Intern. Colloq. Insect Pathol., College Park, U.S.A., 25-28 Aug. 1970, 381-385.

(13) - MEYNADIER, G., FOSSET, J., VAGO, C., DUTHOIT, J.L., BRES, N. (1968). Ann. Epiphyties, 19, 703-705.

(14) - WEISER, J., VAGO, C. (1966). J. Invertebr. Pathol., 8, 314-319.

(15) - BIRD, F.T., SANDERS, C.J., BURKE, J.M. (1971). J. Invertebr. Pathol., 18, 159-161.

(16) - SUTTER, G.R. (1972). J. Invertebr. Pathol., 19, 375-382.

(17) - HENRY, J.H., NELSON, B.P., JUTILA, J.W. (1969). J. Virol., 3, 605-610.

(18) - GÖTZ, P., HUGER, A.M., KRIEG, A. (1969). Naturwissenschaften, 56, 145.

(19) - HUGER, A.M., KRIEG, A., EMSCHERMANN, P., GÖTZ, P. (1970). J. Invertebr. Pathol., 15, 253-261.

(20) - WEISER J. (1969). Acta Virol., 13, 549-553.

(21) - STOLTZ, D.B., SUMMERS, M.D. (1972). J. Ultrastruct. Res., 40, 581-598.

Tableau XIV

CARACTERISTIQUES DES MALADIES A ENTOMOPOXVIRUS

Hôte	Inclusions (forme et taille)		Tissus atteints	Site de multiplication	Origine
	fuseaux	sphérules			
COLEOPTERES :					
Melolontha melolontha (réf. 1, 2, 3, 4 et 5)	fusiformes 1 à 20 µm de long	ovoïdes 10 à 20 µm de diamètre	tissu adipeux hémocytes	cytoplasme formes immatures décrites	France
Demodena boranensis (réf. 6)	losangiques 1 à 26 µm de long	ovoïdes 7 à 13 µm de diamètre	tissu adipeux et épithélial hémocytes	cytoplasme formes immatures décrites	Argentine
Othnonius batesi (réf. 7)	fusiformes 1 à 10 µm de long	ovoïdes 6 à 7 µm de diamètre	tissu adipeux épiderme	cytoplasme formes immatures décrites	Australie
Dermolipida albohirtum (réf. 7)	pas de fuseaux				Australie
Figulus sublaevis (réf. 8)	losangiques ou polyédriques 1 à 5 µm	polymorphes souvent ovoïdes 1 à 5 µm	tissu adipeux	cytoplasme formes immatures décrites	Madagascar
Phyllopertha horticola (réf. 9)	losangiques ou polyédriques 1 à 20 µm	parallélépipèdes angles arrondis 20-25 x 12-15 µm	tissu adipeux	cytoplasme formes immatures décrites	France
Geotrupes silvaticus (réf. 10)	fusiformes 4 à 5 µm de long	oyoïdes 3 à 5 µm de diamètre	tissu adipeux		Pologne

LEPIDOPTERES :					
Amsacta moorei (hôte d'origine) adapté sur *Estigmene acrea* (réf. 11 et 12)	pas de fuseaux	ovoïdes 2 à 6 µm de diamètre	tissu adipeux chaîne nerveuse	cytoplasme formes immatures décrites	Inde
Oreopsyche angustella (réf. 13)	fusiformes 2 à 10 µm de long	ovoïdes 3-10 x 2-7 µm	tissu adipeux et conjonctif hypoderme	cytoplasme formes immatures décrites	France
Operophtera brumata (réf. 14)	fusiformes 1 à 14 µm de long	ovoïdes 2-3 x 1,5-3,5 µm	tissu adipeux		Tchécoslovaquie
Acrobasis zelleri (réf. 14)					Tchécoslovaquie
Choristoneura biennis (réf. 15)	pas de fuseaux	ovoïdes 3,2-5,2 x 2,2-3,3 µm	tissu adipeux intestin moyen		Canada
Euxoa auxiliaris (réf. 16)	pas de fuseaux	ovoïdes 4,7 x 3,7 µm	tissu adipeux hémocytes	cytoplasme formes immatures décrites	Etats-Unis
ORTHOPTERES :					
Melanoplus sanguinipes (réf. 17)	pas de fuseaux	ovoïdes ou cuboïdes 1,5 à 10,5 µm	tissu adipeux	cytoplasme et noyau formes immatures décrites	Etats-Unis
DIPTERES :					
Chironomus luridus (réf. 18)	pas de fuseaux	ovoïdes 4 à 7 µm de diamètre	tissu adipeux et conjonctif disques imaginaux	cytoplasme formes immatures décrites	Allemagne
Camptochironomus tentans (réf. 19)	pas de fuseaux	ovoïdes 2-16 x 2-10 µm	tissu adipeux	cytoplasme formes immatures décrites	Allemagne
Chironomus attenuatus (réf. 20)	pas de fuseaux	ovoïdes 4 à 6 µm de diamètre	hémocytes	cytoplasme formes immatures décrites	Etats-Unis

Tableau XIV

REFERENCES :

(1) - HURPIN, B., VAGO, C. (1963). Rev. Pathol. Végétale Entomol. Agr. Fr., 42, 115-117.

(2) - AMARGIER, A., VAGO, C., MEYNADIER, G. (1964). Mikroskopie, 19, 309-315.

(3) - BONAMI, J.R. (1970). Ann. Soc. Ent. Fr., 6, 451-465.

(4) - DEVAUCHELLE, G., BERGOIN, M., VAGO, C. (1971). J. Ultrastr. Res., 37, 301-321.

(5) - BERGOIN, M., DEVAUCHELLE, G., VAGO, C. (1968). C.R. Acad. Sci. Paris, D 267, 382-385.

(6) - VAGO, C., AMARGIER, A., HURPIN, B., MEYNADIER, G., DUTHOIT, J.L. (1968). Entomophaga, 13, 373-375.

(7) - GOODWIN, R.H., FILSHIE, B.K. (1969). J. Invertebr. Pathol., 13, 317-329.

(8) - VAGO, C., MONSARRAT, P., DUTHOIT, J.L., AMARGIER, A., MEYNADIER, G., VAN WAEREBEKE, D. (1968). C.R. Acad. Sci. Paris, D 266, 1621-1623.

(9) - VAGO, C., ROBERT, P., AMARGIER, A., DUTHOIT, J.L. (1969). Mikroskopie, 25, 378-386.

(10) - LIPA, J.J., BARTKOWSKI, J. (1972). J. Invertebr. Pathol., 20, 218-219.

(11) - GRANADOS, R.R., ROBERTS, D.W. (1970). Virology, 40, 230-243.

(12) - GRANADOS, R.R. (1971). Proc. IVth. Intern. Colloq. Insect Pathol., College Park, U.S.A., 25-28 Aug. 1970, 110-114.

(13) - MEYNADIER, G., FOSSET, J., VAGO, C., DUTHOIT, J.L., BRES, N. (1968). Ann. Epiphyties, 19, 703-705.

(14) - WEISER, J., VAGO, C. (1966). J. Invertebr. Pathol., 8, 314-319.

(15) - BIRD, F.T., SANDERS, C.J., BURKE, J.M. (1971). J. Invertebr. Pathol., 18, 159-161.

(16) - SUTTER, G.R. (1972). J. Invertebr. Pathol., 19, 375-382.

(17) - HENRY, J.H., NELSON; B.P., JUTILA, J.W. (1969). J. Virol., 3, 605-610.

(18) - HUGER, A.M., KRIEG, A., EMSCHERMANN, P., GOTZ, P. (1970). J. Invertebr. Pathol., 15, 253-261.

(19) - WEISER, J. (1969). Acta Virol., 13, 549-553.

(20) - STOLTZ, D.B., SUMMERS, M.D. (1972). J. Ultrastruct. Res., 40, 581-598.

CHAPITRE V

COMPARAISONS ENTRE POXVIRUS DE VERTEBRES ET D'INVERTEBRES

Pages

I - MORPHOLOGIE ET STRUCTURE DES VIRIONS 129

A - Généralités 129

B - L'enveloppe 131

1 - Définition des formes "M" et "C" 131

2 - L'ornementation de la surface du virion 133

3 - Structure de l'enveloppe 135

C - Le nucléoïde 136

1 - Problème de terminologie 136

2 - La coque du nucléoïde 137

3 - Structure interne du nucléoïde 139

D - Les corps latéraux 142

E - Nature chimique des constituants du virion 143

1 - L'enveloppe 143

2 - Les corps latéraux et la coque du nucléoïde 144

3 - L'intérieur du nucléoïde 144

Pages

II - COMPOSITION CHIMIQUE 146

A - Analyse globale 146

B - L'acide nucléique 146

C - Les protéines 147

III - SEROLOGIE 148

A - Les antigènes solubles 148

B - Les antigènes extraits des virions purifiés 148

C - Relations sérologiques entre antigènes solubles et antigènes extraits des virions purifiés 150

D - Relations sérologiques entre poxvirus de vertébrés 150

E - Relations sérologiques entre poxvirus de vertébrés et d'invertébrés 151

IV - CYCLE DE REPLICATION VIRALE 151

A - Pénétration des virions 152

B - Début des synthèses virales 153

C - Morphogénèse virale 155

D - Dissémination des virions 160

V - CONCLUSIONS 163

CHAPITRE V

COMPARAISONS ENTRE POXVIRUS DE VERTEBRES ET D'INVERTEBRES

La somme des connaissances acquises sur les poxvirus de vertébrés est à l'heure actuelle considérable. Elle est le résultat de recherches approfondies menées avec opiniâtreté depuis plus de 20 ans par de nombreuses équipes de recherches dans le monde entier. Bien que certains aspects de leur biologie demeurent encore obscurs, les poxvirus sont parmi les mieux connus des virus de vertébrés.

Il n'est pas possible de présenter ici, même de façon succincte, l'ensemble des connaissances sur ces virus, dont on trouvera une analyse exhaustive dans d'excellentes revues parues récemment (JOKLIK, 1966, 1968a, b ; WOODSON, 1968). Nous nous limiterons au contraire dans ce chapitre à l'exposé des données que nos connaissances encore modestes des entomopoxvirus nous permettent de comparer valablement.

I - MORPHOLOGIE ET STRUCTURE DES VIRIONS

A - Généralités

Ainsi que le souligne JOKLIK (1968a) dans une revue récente sur les poxvirus, l'appartenance d'un virus à ce groupe repose essentiellement sur des critères morphologiques, tant est caractéristique l'aspect des virions. Sur la base de ces critères, on distingue deux grands types de poxvirus : le type vaccine et le type paravaccine (voir tableau XV, p. 164).

Le premier rassemble les membres des 3 sous-groupes suivants :

- sous-groupe de la vaccine dont le représentant type est le virus vaccinal ;
- sous-groupe des virus de myxome et de fibrome dont le virus de la myxomatose et celui du fibrome de Shope sont les principaux représentants ;
- sous-groupe des poxvirus aviaires avec le virus de la variole aviaire (fowlpox) comme représentant le mieux connu.

Les virions de ces 3 sous-groupes sont indiscernables entre eux par leur morphologie mais diffèrent par leurs propriétés sérologiques. Ils ont la forme de parallélipipèdes à contours émoussés ("brick-shaped") ou, de façon plus imagée et semble-t-il plus réaliste, de "pastèques" (MEDZON et BAUER, 1970). Leurs dimensions se situent entre 200-250 nm x 250-300 nm. Examinée en coloration négative, leur surface apparaît couverte de rides donnant au virion l'aspect d'une mûre.

Les virions du deuxième type appartiennent au sous-groupe des paravaccines, dont le virus de l'echtyma contagieux (virus orf) est le prototype. Ils sont de forme ovoïde et de taille plus petite (160 x 260 nm). Leur surface est parcourue par un filament disposé en spirale régulière.

La structure des poxvirus est fort complexe et son élucidation est le résultat de nombreux travaux ayant nécessité la mise en oeuvre d'un grand nombre de techniques de microscopie électronique. L'architecture de base d'un poxvirus, telle qu'elle a été définie dans le travail classique de PETERS (1956) comprend 3 composants majeurs :

- une enveloppe portant à sa surface externe une ornementation caractéristique de l'un ou l'autre type défini ci-dessus ;
- un corps central biconcave, le nucléoïde, en forme d'haltère, délimité par une coque à deux couches ;
- deux corps latéraux remplissant l'espace situé entre l'enveloppe et le nucléoïde.

Pour la description détaillée de ces différents constituants structuraux, nous prendrons essentiellement comme modèle le virus vaccinal qui a fait l'objet des études les plus approfondies dans ce domaine et nous comparerons ces données à celles que nous possédons sur les poxvirus d'insectes.

B - L'enveloppe

1 - Définition des formes "M" et "C"

Lorsqu'on examine au microscope électronique une suspension hautement purifiée de virus de la vaccine, après coloration négative à l'acide phosphotungstique, on remarque deux types de particules, en proportion variable selon la technique de préparation de l'échantillon :

- des particules non pénétrées par l'APT dont on distingue nettement l'ornementation de surface (Pl. LI, Fig. 152) ;

- des particules dans lesquelles l'acide phosphotungstique a pénétré, révélant ainsi leur structure interne (Pl. LI, Fig. 153 et 154). L'ornementation de surface du virion est peu ou n'est pas reconnaissable sur ces particules.

L'appellation donnée à ces deux types de particules ainsi que leur interprétation ont varié suivant les nombreux auteurs qui ont étudié ce virus, dont HERZBERG et Coll. (1961) ; PETERS et Coll. (1962) ; NAGINGTON et HORNE (1962) ; NOYES (1962 a et b) ; DALES (1963) ; WESTWOOD et Coll. (1964). L'interprétation selon laquelle ces deux formes sont l'image d'une même entité structurale, le virion (particule mûre), intacte ou faiblement endommagée (NOYES, 1962b) et leur désignation par les lettres "M" et "C" proposées par WESTWOOD et Coll. (1964) rallient actuellement l'unanimité des spécialistes. Selon ces derniers auteurs, une suspension de virus vaccinal fraîchement préparée et observée en coloration négative renferme 80 à 90 % de formes non pénétrées par l'APT et désignées par la lettre "M" à cause de leur surface bosselée donnant à la particule l'aspect d'une mûre (mulberry-like particle). Les 10 à 20 % de virions restants sont pénétrés par

l'APT, leur taille est légèrement supérieure et le complexe membranaire situé à la périphérie évoque une "capsule", d'où leur désignation par la lettre "C" (capsulated particle).

La proportion de formes "M" et "C" varie considérablement suivant le traitement subi par les virions, avant ou après leur dépôt sur grille. Par exemple, en faisant flotter sur une goutte de tampon glycine de pH 11 une grille sur laquelle on a préalablement déposé du virus, ces auteurs observent qu'au bout d'une heure 95 % des virions sont transformés en formes "C". HARRIS et WESTWOOD (1964), étudiant en détail l'interconvertibilité entre formes "M" et "C", montrent que des facteurs jusqu'alors insoupçonnés, tels le temps pendant lequel on laisse sécher les virus sur la grille avant de les colorer, la nature du film support recouvrant les grilles, le délai entre le moment de la coloration et celui de l'examen des grilles au microscope électronique influent considérablement sur la proportion de formes "M" et "C" observées. La conversion, se faisant généralement dans le sens forme "M" → forme "C", s'avère irréversible après traitement chimique des virions (WESTWOOD et al., 1964). Par contre, l'effet de la dessication précédant la coloration est réversible si l'on réhydrate les virions avant de les colorer. EASTERBROOK (1966) a également démontré qu'en incubant à 37°C une suspension de virus de la vaccine en présence du détergent non ionique NP-40, toutes les formes "M" sont converties en formes "C" au bout d'une heure.

Les formes "M" et "C" de virions ont été observées chez plusieurs autres poxvirus, dont le virus de la myxomatose (CHAPPLE et WESTWOOD, 1963), du fibrome de Shope (SCHERRER, 1968), de la variole aviaire (HYDE et Coll., 1965), du *Molluscum contagiosum* et de la tumeur Yaba (NOYES, 1965), de l'echtyma contagieux (NAGINGTON et HORNE, 1962) et de la variole ovine (COHEN et Coll., 1971).

Chez les entomopoxvirus, nous avons vu que ces deux formes coexistent toujours dans les suspensions de virus purifiés, bien que nous ne les ayions pas désignées par des sigles particuliers (voir chapitre II, section III A ; chapitre III, section III B et Pl. LI, Fig. 155-158). Lors de la purification des virus par dissolution des sphérules, la proportion de formes "M" et "C" dépend étroitement du temps pendant lequel les virions

libérés restent en contact avec le tampon thioglycolate. Tout contact prolongé avec ce tampon aboutit à la transformation des formes "M" en formes "C" puis à la dégradation plus poussée des particules (Pl. LIII, Fig. 163 et 164).

2 - *L'ornementation de la surface du virion*

L'ornementation de la surface du virion des poxvirus a fait l'objet de nombreux travaux et d'interprétations diverses. Chez la vaccine, NOYES (1962 a et b) considère que la surface du virion est couverte de projections de 100-150 Å de diamètre et 100 Å de haut. Partant d'une base relativement large (environ 150 Å), ces projections s'amincissent et leur extrémité arrondie mesure environ 65 Å de diamètre. Par suite d'une faible dénaturation au cours de la purification, ces structures relativement labiles se réuniraient pour former des "côtes" à la surface du virion. Structures sphériques et côtes seraient formées de petites unités en forme d'anneaux ou de tubules recouvertes par une enveloppe à laquelle elles adhéreraient fortement.

DALES (1963) décrit à la surface du virion des rides ayant l'apparence de bâtonnets ou de tubules de 70 Å de large et pouvant atteindre 1.000 Å de long. Pour NAGINGTON et HORNE (1962), ces tubules ont un axe creux de 20-30 Å de diamètre ; selon MÜLLER et PETERS (1963) et aussi WESTWOOD et Coll. (1964), ils seraient constitués par une double hélice de filaments de 25-30 Å d'épaisseur. Les tubules sont généralement disposés de façon irrégulière, parfois enchevêtrés, si bien que l'on ne peut suivre leur contour que sur une faible distance. Occasionnellement, toutefois, certaines particules, comme celle représentée sur la figure 152 (Pl. LI), montrent à leur périphérie un arrangement d'anses disposées à intervalles réguliers et donnant au virion un contour crénelé.

Tous ces auteurs ont utilisé comme technique de base, dans leurs études, la coloration négative à l'acide phosphotungstique selon BRENNER et HORNE (1959). Suivant la technique de purification du virus et, d'une manière plus générale, suivant le traitement subi par les virions avant leur examen, les images qu'ils ont obtenues n'étaient pas toujours rigoureu-

sement les mêmes, ce qui explique certaines divergences dans l'interprétation qu'ils en donnent.

Utilisant la technique de cryodécapage, MEDZON et BAUER (1970) ont récemment apporté une explication des structures décrites par les auteurs ci-dessus. La surface du virion de la vaccine est en fait parcourue par des doubles rangées de petites unités globulaires formant des rides disposées sans ordre apparent mais ne s'entrecroisant jamais. Chaque ride, de longueur variable, mesure environ 150 Å de large et la distance de centre à centre entre les deux rangées qui la constituent est d'environ 100 Å. Les unités globulaires de chaque ride ont environ 50 Å de diamètre et elles sont séparées les unes des autres par un espace régulier de 65-70 Å. La hauteur des rides au-dessus de la surface de l'enveloppe est approximativement de 150 Å. Les structures tubulaires, filamenteuses ou hélicoïdales observées après coloration à l'acide phosphotungstique résultent donc d'un dépôt du colorant, entre les rides d'une part, et entre deux rangées d'unités globulaires formant la double ride de l'autre. L'entrecroisement des filaments observés après coloration est dû à la superposition de structures observées par transparence.

L'ornementation de surface du virion est à ce point semblable dans les trois sous-groupes de la vaccine, des poxvirus aviaires et des poxvirus de myxome et fibrome qu'on ne peut les distinguer par ce caractère.

Contrastant avec l'absence d'arrangement apparent des rides parcourant la surface des virions de ces 3 sous-groupes, les virions du sous-groupe des paravaccines présentent une ornementation remarquablement ordonnée. Ainsi, chez le virus de l'etchyma contagieux et de la stomatite papuleuse bovine, un filament unique de 100-120 Å de diamètre forme un enroulement de 12 à 15 spires régulièrement espacées à la surface du virion (BÜTTNER et al., 1964 ; NAGINGTON et al., 1964). Le filament possède une structure périodique de 40-45 Å.

L'ornementation de la surface des entomopoxvirus, telle qu'elle apparaît sur les formes "M" des virions des souches étudiées, diffère sensiblement de celle décrite chez les poxvirus de vertébrés. On n'observe ni structure filamenteuse ou tubulaire ni spirale mais des protubérances sphé-

riques toutes semblables, de 220 Å de diamètre chez l'entomopoxvirus de *Melolontha* ou de 400 Å chez l'entomopoxvirus d'*Amsacta* (Pl. LI, Fig. 155 et 157). Ces unités sont réparties sur toute la surface du virion, sans arrangement apparent. Cette ornementation et leur forme ovoïde font que l'adjectif mûriforme décrit particulièrement bien l'aspect de ces virus.

Les structures digitées que nous avons observées dans certaines préparations d'enveloppes vides de l'entomopoxvirus de *Melolontha* correspondraient à un gonflement des éléments globuleux de surface sous l'action du thioglycolate, comme le suggèrent les nombreuses formes de transition (voir Pl. LIII, Fig. 163 et 164).

3 - *Structure de l'enveloppe*

Selon WETSWOOD et Coll. (1964), l'enveloppe externe des formes "C" du virion de la vaccine est délimitée par une membrane plurilamellaire crénelée dont les dents sont séparées par le même intervalle que celles observées sur les formes "M" (Pl. LV, Fig. 173). Son épaisseur moyenne est d'environ 125 Å. Pour PETERS et BÜTTNER (1965a), l'enveloppe est formée d'une double membrane d'environ 200 Å d'épaisseur. L'enveloppe externe du virus du fibrome de Shope est constituée d'une membrane unitaire d'environ 100 Å d'épaisseur recouverte par une couche périphérique de même épaisseur dont la structure réelle est mal connue (SCHERRER, 1971).

La présence d'une enveloppe supplémentaire recouvrant l'ornementation de surface des formes "M" est mentionnée par plusieurs auteurs chez différents poxvirus dont le virus vaccinal (NOYES, 1962b ; NAGINGTON et HORNE, 1964 ; WESTWOOD et Coll., 1964), le virus de l'echtyma contagieux (NAGINGTON et HORNE, 1964 ; SHERRER, 1971), le rabbit pox (APPLEYARD et al., 1971) et le virus de la tumeur Yaba (NOYES, 1965). Selon WESTWOOD et Coll. (1964), cette enveloppe s'observe assez fréquemment dans les préparations de virus vaccinal non purifiées alors qu'elle est rarement visible après purification.

Des virions entourés d'une ou de plusieurs enveloppes supplémentaires d'origine cellulaire ont été également observés sur coupes

ultra-fines de cellules infectées par le virus vaccinal (DALES, 1963 ; HOLLOS et LOVAS, 1968 ; ICHIHASHI et al., 1971), le virus du fibrome de Shope (SCHERRER, 1968), le virus de la tumeur Yaba (deHARVEN et YOHN, 1966), le virus de la clavelée (COHEN et Coll., 1971). Ces enveloppes, qui proviennent soit de vésicules ergastoplasmiques, soit de la membrane cellulaire, apparaissent au moment de la dissémination des virions, comme nous le verrons plus loin.

Chez les entomopoxvirus, nous n'avons pu définir avec précision la structure fine de l'enveloppe des virions. En particulier, le nombre de membranes la constituant demeure inconnu. L'examen en coupes ultra-fines de virions inclus dans les sphérules et des virions colorés à l'acide phosphotungstique indique toutefois clairement que les replis de l'enveloppe sont responsables de l'ornementation de surface de la particule (Pl. XVIII, Fig. 52 et Pl. LI, Fig. 156 et 158). Le hâlo clair entourant les virions inclus pourrait correspondre à un matériel indifférencié recouvrant les éléments globuleux et être assimilable à l'enveloppe supplémentaire décrite par WESTWOOD et Coll. (1964) chez le virus vaccinal. Il n'est cependant pas exclu que ce hâlo dont les dimensions varient en fonction du mode de fixation soit dû à des artéfacts de préparation (Pl. XIX, Fig. 53 à 56).

C - Le nucléoïde

1 - Problème de terminologie

Il existe une certaine confusion dans la littérature sur les poxvirus concernant la désignation des structures internes du virion. Certains auteurs de langue anglaise (DALES, 1963 ; EASTERBROOK, 1966) désignent par le terme de "core" l'ensemble des structures internes, y compris la coque à deux couches qui les délimite. D'autres (PETERS et MÜLLER, 1963 ; PETERS et BÜTTNER, 1965a), désignent par ce terme uniquement l'élément central biconcave, à l'exclusion de la coque. Dans des travaux plus récents de cette dernière équipe (PETERS et KÜPER, 1970 ; HYDE et PETERS, 1971), le terme de "core" est repris pour désigner l'ensemble de la coque et de l'élément central, ce dernier étant appelé "nucleoid". Dans sa description du virion du fibrome de Shope, SCHERRER (1971) fait également la distinction entre

le "nucléoïde" d'une part et la coque qui l'entoure de l'autre qu'il nomme "coque interne". Il désigne l'ensemble de ces structures par le terme de "corps central".

Dans notre exposé, nous désignerons sous l'appellation commune de "nucléoïde" l'ensemble des structures internes du virion comprenant la coque et son contenu. La terminologie existante nous paraît en effet suffisamment complexe pour ne pas la compliquer davantage. Nous pensons, d'autre part, que cet ensemble constitue un tout structuralement et fonctionnellement indissociable.

2 - *La coque du nucléoïde*

La pénétration par l'acide phosphotungstique du virion de la vaccine (forme "C") révèle une zone d'environ 150 Å d'épaisseur située immédiatement sous l'enveloppe. Lorsque le virion est observé dans son plan le plus large (vue de dessus), cette zone épouse exactement le contour rectangulaire de l'enveloppe (Pl. LI, Fig. 154). Par contre, dans un plan longitudinal perpendiculaire au précédent (vue de profil), cette zone s'invagine selon le grand axe du virion et son contour prend alors la forme caractéristique biconcave (Pl. LI, Fig. 153). On retrouve exactement cette disposition sur une coupe ultra-fine du virion passant par ce même plan (Pl. LII, Fig. 159). Cette zone représente la coque du nucléoïde. Elle est constituée d'une couche externe, d'environ 100 Å d'épaisseur, formée par la juxtaposition de spicules et d'une couche interne mince non différenciée (DALES, 1963) ; EASTERBROOK, 1966).

Selon WESTWOOD et Coll. (1964), les spicules formant la couche externe ("pallisaded zone") sont des cylindres creux d'environ 90 Å de large disposés à intervalles réguliers. La couche interne, d'environ 45 Å d'épaisseur, serait elle-même constituée de petites sous-unités séparées par les mêmes intervalles que les spicules de la couche externe (Pl. LV, Fig. 173). Une organisation semblable de la coque du nucléoïde existe chez le virus du fibrome de Shope (SCHERRER, 1971). La disposition radiaire des spicules à la surface de la coque s'observe clairement sur des coupes fines de nucléoïdes libres dans le cytoplasme ou sur des nucléoïdes isolés selon la

technique d'EASTERBROOK (Pl. LIII, Fig. 167 et 168 et Pl. LIV, Fig. 172).

La coque du nucléoïde des entomopoxvirus, d'une épaisseur totale d'environ 150 Å, est considérée comme étant formée de 3 couchez chez l'entomopoxvirus de *Melolontha* et d'*Othnonius batesi* (GOODWIN et FILSHIE, 1969), et de 2 couches seulement chez l'entomopoxvirus d'*Amsacta* (GRANADOS et ROBERTS, 1970) (Pl. LII, Fig. 161). Nous pensons que la fine couche de forte densité aux électrons séparant les deux couches claires de cette coque correspond à une entité structurale (Pl. LII, Fig. 160). Nous voudrions faire remarquer à ce propos que cette couche médiane apparaît clairement dans le schéma que WESTWOOD et Coll. (1964) donnent du virion de la vaccine (Pl. LIV, Fig. 173).

La couche externe, d'environ 70-80 Å chez les entomopoxvirus de coléoptères, ne peut être résolue en sous-unités sur coupes fines de virions (Pl. LII, Fig. 160). Par contre, la coloration à l'APT révèle à la surface des nucléoïdes libres de petites sous-unités tubulaires d'environ 50 Å de diamètre. Leur nombre est apparemment beaucoup plus réduit que celui des mêmes sous-unités observées à la surface des nucléoïdes de la vaccine (Pl. LIII, Fig. 163, 167 et 168). Nous pensons que cette différence est due à la dégradation de plusieurs d'entre elles sous l'effet d'un contact prolongé avec le thioglycolate. EASTERBROOK (1966) a, en effet, montré qu'il était possible, dans certaines conditions, d'obtenir des nucléoïdes dépourvus de leurs spicules, sans que leur forme générale soit modifiée.

Des sous-unités tubulaires semblables, mesurant 110 Å de long et 60 Å de diamètre, ont également été décrites par GRANADOS et ROBERTS (1970) chez l'entomopoxvirus d'*Amsacta* sur coupes fines de nucléoïdes libres dans le cytoplasme, ou à la surface de nucléoïdes libres colorés négativement à l'APT (Pl. LIII, Fig. 166 et Pl. LIV, Fig. 171).

Contrairement aux poxvirus de vertébrés dont la coque du nucléoïde est toujours biconcave en coupe longitudinale (Pl. LII, Fig. 159), celle des entomopoxvirus est dans ce même plan, réniforme chez les coléoptères (Pl. LII, Fig. 160), cylindrique ou faiblement biconcave chez les lépidoptères (Pl. LII, Fig. 161 ; Pl. LIV, Fig. 169 et 170) et franchement bi-

concave chez les diptères. Cette diversité de forme, avec les conséquences qu'elle entraîne sur la disposition et le nombre des corps latéraux (voir plus loin), confère aux entomopoxvirus une forte originalité. Elle fournit d'importants critères pour la distinction de sous-groupes au sein de ces virus, comme nous l'avons vu au chapitre précédent.

3 - *Structure interne du nucléoïde*

L'acide phosphotungstique tamponné à des pH compris entre 5 et 7 ne révèle pas la structure interne du nucléoïde ainsi que l'ont noté plusieurs auteurs chez différents poxvirus de vertébrés, celui de la vaccine (NAGINGTON et HORNE, 1962 ; NOYES, 1962a ; WESTWOOD et al., 1964 ; EASTERBROOK, 1966), de la variole aviaire (HYDE et al., 1965), du fibrome de Shope (SCHERRER, 1968), de l'echtyma contagieux (NAGINGTON et HORNE, 1962), de la tumeur Yaba et du *Molluscum contagiosum* (NOYES, 1965). Cette constatation est généralement interprétée comme la non pénétration du colorant au-delà de la coque du nucléoïde. Un traitement préalable du virion par la trypsine, l'urée ou des solutions alcalines allant jusqu'à pH 12 ne rend pas cette coque davantage perméable au colorant (WESTWOOD et al., 1964). En traitant des nucléoïdes isolés du virion de la vaccine par du désoxycholate de sodium à 0,5 %, EASTERBROOK (1966) a obtenu une bonne pénétration du colorant qui révèle alors un matériel fibrillaire fin. C'est également un matériel fibrillaire que l'on observe à l'intérieur du nucléoïde sur coupes fines de ces virions fixés, inclus et colorés par les techniques classiques de microscopie électronique (Pl. LII, Fig. 159).

C'est aux travaux de PETERS et de son équipe que l'on doit l'élucidation de la structure interne du nucléoïde des poxvirus. Utilisant la coloration à l'APT à pH 10,5 et différents modes de fixation (éthanol acétique, formaldéhyde, glutaraldéhyde) suivie d'une inclusion dans l'épon, ces auteurs ont mis en évidence à l'intérieur du nucléoïde du virus vaccinal un ensemble de trois éléments cylindriques semblables, de faible opacité aux électrons, qu'ils ont appelé "triplet" (MÜLLER et PETERS, 1963 ; PETERS et MÜLLER, 1963 ; PETERS et BÜTTNER, 1964, 1965b). Ces éléments, de 400 à 500 Å de diamètre, sont disposés selon le grand axe du virion et occupent toute la longueur du nucléoïde. Certaines images suggèrent qu'il s'agit d'un seul

élément replié sur lui-même en forme de S.

Au centre de chaque élément, une zone axiale de 100-150 Å de diamètre apparaît tantôt dense, tantôt claire aux électrons, suivant le type de fixation. Entourant ces éléments, une substance de forte densité aux électrons délimite nettement le contenu du nucléoïde de sa coque.

Une structure comparable a été également reconnue chez d'autres poxvirus, tels les virus de l'echtyma contagieux et de la stomatite papuleuse bovine (BÜTTNER et Coll., 1964 ; PETERS et Coll., 1964), le virus de *Molluscum contagiosum* (PETERS et KUPER, 1970), le virus de la variole aviaire (HYDE et PETERS, 1970), et probablement le virus du fibrome de Shope (SCHERRER, 1971). Le nombre et la taille des éléments cylindriques varient selon les virus. C'est ainsi que les virus du groupe des paravaccines possèdent trois éléments dont le diamètre est seulement de 300 Å, alors que chez le virus de *Molluscum contagiosum* on dénombre de 4 à 6 éléments dont le diamètre est compris entre 120 et 180 Å (PETERS et KUPER, 1970 ; BÜTTNER et al., 1964).

Chez le virus de la variole aviaire, HYDE et PETERS (1971) ont récemment proposé un schéma complexe de ces éléments (Pl. LV, Fig. 174). Comme pour le virus de la vaccine, il semble que l'on soit en présence d'un élément unique replié plusieurs fois sur lui-même et dont on dénombre couramment 5 à 8 sections sur une même coupe. La structure de cet élément n'est pas la même sur toute sa longueur. C'est ainsi que les auteurs distinguent une portion renflée ayant en coupe transversale l'aspect d'une fleur à 7 pétales qu'ils nomment le "blumchen" et une portion étroite ayant dans le même plan une section circulaire. Le "blumchen" est constitué par une zone centrale tubulaire d'environ 130 Å de diamètre portant à sa périphérie des unités en forme de pétales de 50 Å de diamètre et 60 Å de long disposées radialement et semble-t-il en hélice. Le diamètre total du "blumchen" est de 250 Å environ et sa longueur, estimée à l'aide de coupes sériées, serait comprise entre 700 et 1.400 Å. Au centre du "blumchen" une zone axiale de 50 Å possède toujours une forte opacité aux électrons.

La portion étroite faisant suite au "blumchen" correspondrait au prolongement de la structure tubulaire centrale de ce dernier dont elle

possède le diamètre (130 Å) et la zone axiale dense aux électrons.

L'intérieur du nucléoïde des entomopoxvirus présente une structure aussi complexe que celle que nous venons de décrire chez les poxvirus de vertébrés. La présence d'éléments cylindriques comparables au "triplet" a été reconnue à l'intérieur du nucléoïde de plusieurs d'entre eux.

Sur coupes fines de l'entomopoxvirus de *Melolontha*, on distingue 3 à 6 éléments d'environ 200 Å de diamètre disposés dans un plan sensiblement horizontal (Pl. XIX, Fig. 55). Au centre de chaque élément, se trouve une zone axiale de forte opacité aux électrons. Sur coupes horizontales ou longitudinales, ces éléments occupent toute la longueur du nucléoïde et certaines images suggèrent qu'ils ne formeraient qu'un seul filament replié plusieurs fois sur lui-même (Pl. XIX, Fig. 53 et 54). Une disposition semblable de ces éléments semble prévaloir chez les autres entomopoxvirus de coléoptères (GOODWIN et FILSHIE, 1969 ; VAGO et al., 1968 a et b, 1969).

Dans les nombreuses coupes fines de virions libres ou en voie d'inclusion dans les sphérules que nous avons examinées, nous n'avons jamais observé ces éléments dans le nucléoïde de l'entomopoxvirus de *Melolontha*, quelles que soient les conditions de fixation ou d'inclusion. Après coloration négative à l'APT tamponné à pH voisin de la neutralité, ces éléments ne sont pas davantage visibles dans les virions ou les nucléoïdes libres. Ils s'observent par contre de façon régulière dans les coupes de virions inclus dans les sphérules. Ces résultats peuvent s'interpréter de deux façons : soit ces structures d'une grande fragilité sont conservées uniquement dans les virions inclus dans les sphérules où les fixateurs pénétreraient moins facilement, soit elles n'apparaissent qu'après l'inclusion des virions, comme le résultat d'une maturation de ces dernières. L'utilisation des techniques préconisées par PETERS pour l'étude ultrastructurale du virion de la vaccine devrait permettre de trancher entre ces deux possibilités.

Il y a tout lieu de penser que cette structure est en fait assez labile. Dans les préparations de virus laissées en présence de thioglycolate pendant 20 à 30 minutes et donc contenant un grand nombre de nucléoïdes dégradés, nous n'avons, en effet, jamais observé d'images rappelant

cette structure ; son isolement chez les poxvirus de vertébrés n'a pu être obtenue (EASTERBROOK, 1966 ; HYDE et al., 1965).

Chez l'entomopoxvirus d'*Amsacta*, GRANADOS et ROBERTS (1970) ont observé ces éléments aussi bien dans les virions libres dans le cytoplasme ou inclus dans les sphérules que dans les nucléoïdes libres isolés et colorés à l'APT (Pl. LII, Fig. 161 ; Pl. LIII, Fig. 165 ; Pl. LIV, Fig. 170). Les techniques utilisées par ces auteurs étant semblables aux nôtres, il semble donc que cette structure soit moins labile chez ce virus. Ces éléments ont été reconnus également chez d'autres entomopoxvirus de lépidoptères (MEYNADIER et al., 1968 ; SUTTER, 1972).

Le contenu du nucléoïde chez l'entomopoxvirus de *Melanoplus sanguinipes* (orthoptère) et les entomopoxvirus de diptères possède une structure fibrillaire de forte opacité aux électrons dans laquelle on ne distingue généralement pas d'éléments cylindriques (HENRY et al., 1969 ; GÖTZ et al., 1968 ; WEISER, 1969).

D - Les corps latéraux

Les corps latéraux se présentent chez tous les poxvirus de vertébrés comme deux éléments lenticulaires plus ou moins développés et disposés parallèlement au grand axe du virion. Ils sont logés entre l'enveloppe externe du virion et la coque du nucléoïde dont ils épousent la forme (Pl. LII, Fig. 159). Du fait de leur position latérale et de leur longueur plus réduite que celle du virion, ils ne sont visibles que dans certains plans. Leur structure est soit amorphe, soit finement granuleuse.

Corrélativement à la conformation de leur nucléoïde, les virions des entomopoxvirus présentent une plus grande diversité dans la disposition des corps latéraux. C'est ainsi que seuls ceux des entomopoxvirus de diptères dont le nucléoïde est nettement biconcave possèdent deux corps latéraux bien développés. Chez les entomopoxvirus de lépidoptères et d'orthoptères, on distingue deux corps latéraux discrets de part et d'autre du nucléoïde cylindrique ou faiblement concave (Pl. LII, Fig. 161). Enfin, les virions des entomopoxvirus des coléoptères sont caractérisés par la présence

d'un seul corps latéral volumineux logé dans l'unique concavité du nucléoïde (Pl. LII, Fig. 160).

E - Nature chimique des constituants du virion

1 - L'enveloppe

L'effet de différents traitements, particulièrement l'action de la trypsine, des solvants, des lipides, sur la transformation des formes "M" en formes "C" a conduit WETSWOOD et Coll. (1964) à émettre l'hypothèse que l'enveloppe du virion de la vaccine était vraisemblablement de nature lipoprotéinique. La dégradation de l'enveloppe de ce virus par l'action successive du détergent non ionique NP-40 et du 2-mercaptoéthanol (EASTERBROOK, 1966) est également en faveur de cette hypothèse. Enfin, les résultats du traitement des virions de la vaccine et de l'echtyma contagieux par des solvants des lipides, des enzymes lipolytiques et protéolytiques et le 2-mercaptoéthanol a conduit MITCHINER (1969) a formuler une hypothèse semblable.

DALES et MOSBACH (1968) ont démontré, à l'aide de précurseurs marqués (mélange d'acides aminés marqués au ^{14}C et ^{3}H-choline), que l'enveloppe du virion de la vaccine est constituée à la fois de protéines et de phospholipides dont la lécithine est le composant majeur. Ces constituants sont assemblés au moment de la formation de la membrane des particules immatures. HOLOWCZAK (1970) ainsi que GARON et MOSS (1971) ont, d'autre part, mis en évidence et isolé une glycoprotéine associée à l'enveloppe du virion de la vaccine. Il ressort de ces analyses que l'enveloppe du virion est de nature lipoprotéinique et qu'elle renferme également une fraction glycoprotéinique.

La présence de lipides dans l'enveloppe des entomopoxvirus n'a pas été recherchée à ce jour. Il est toutefois logique de penser que le comportement de ces virus en milieu alcalin et en présence de réducteurs, très semblable à celui des poxvirus de vertébrés, reflète une composition chimique de l'enveloppe analogue. Nous avons, d'autre part, constaté (Pl. XXII, Fig. 68) une réaction positive à la coloration des glycoprotéines selon RAMBOURG (1967) du hâlo entourant les virions de l'entomopoxvirus de

Melolontha inclus dans les sphérules, suggérant la présence d'un composé de cette nature dans leur enveloppe.

2 - *Les corps latéraux et la coque du nucléoïde*

De nombreux auteurs ont étudié l'action de différentes enzymes protéolytique sur des particules entières de poxvirus de vertébrés. Sans entrer dans le détail de ces travaux, nous retiendrons qu'à des degrés divers, ces enzymes digèrent la plupart des structures virales à l'exception, toutefois, de l'enveloppe dont seule l'ornementation de surface est détériorée (LEPINE et al., 1948 ; DAWSON et McFARLANE, 1948 ; PETERS et STOECKENIUS, 1954 a et b ; PETERS, 1956, 1960 ; BUTTNER et al., 1964 ; HYDE et al., 1965 ; SCHERRER, 1971). La perte générale de contraste des virions observés en coloration négative après ces traitements rend difficile la localisation précise des structures dégradées. Par contre, la digestion enzymatique sur coupes ultra-fines, selon la technique de MONNERON et BERNHARD (1966), permet une analyse plus précise du site d'action de ces enzymes. C'est ainsi que SCHERRER (1968, 1971) a montré que la pronase digère complètement les corps latéraux et la coque du nucléoïde du virion du fibrome de Shope alors que le contenu du nucléoïde et l'enveloppe sont respectés. Nous avons obtenu des résultats semblables en employant cette technique sur coupes ultra-fines de l'entomopoxvirus de *Melolontha* (Pl. XXII, Fig. 70 et 71).

EASTERBROOK (1966) a également constaté qu'après dénudation du virion une courte incubation des nucléoïdes dans la trypsine suffit à digérer les corps latéraux, une action prolongée de cette enzyme entraînant la dislocation du nucléoïde.

3 - *L'intérieur du nucléoïde*

La localisation de l'acide nucléique dans le virion a été mise en évidence par PETERS et son équipe par une série de travaux mettant en jeu diverses techniques de microscopie électronique. Dès 1954, PETERS et STOECKENIUS déduisaient de l'action combinée de la pepsine et de la DNase sur des suspensions de virus de *Molluscum contagiosum* et de la vaccine que l'ADN viral était contenu à l'intérieur du nucléoïde. Ces résultats ont été

confirmés ultérieurement par l'emploi de différents fixateurs et de colorants spécifiques de l'ADN comme le chlorure d'indium (PETERS et BUTTNER, 1965 ; PETERS, 1966) et l'argent méthénamine (PETERS, 1966 ; PETERS et GIESE, 1969 ; HYDE et PETERS, 1971). Ces colorants imprègnent fortement la substance fondamentale du nucléoïde qui se distingue ainsi nettement de la couche interne de la coque. L'élement tubulaire ("triplet") n'est pas coloré, à l'exception de l'axe central qui pourrait contenir également de l'ADN.

Selon HYDE et PETERS (1971), l'élément tubulaire à l'intérieur du nucléoïde du virion de la variole aviaire servirait de "squelette" sur lequel s'enroulerait la molécule d'ADN.

Nous avons pu démontrer, grâce aux techniques de digestion à la DNase et de coloration spécifique de l'ADN selon la technique de BERNHARD (1969) et de CHARRET (1969), que le génome de l'entomopoxvirus de *Melolontha* était également localisé dans le nucléoïde des virions (Pl. XXII, Fig. 64-67). Certaines images suggèrent, d'autre part, que l'élément tubulaire à l'intérieur du nucléoïde pourrait contenir de l'ADN dans sa zone axiale comme celui des poxvirus de vertébrés (Pl. XIX, Fig. 55). Il y a donc tout lieu de penser que l'organisation de la molécule d'ADN dans le virion est la même chez les poxvirus de vertébrés et ceux d'insectes.

Dans leurs "Remarques sur les caractéristiques de la particule virale infectieuse", LWOFF et collaborateurs (1959) ont créé le terme de capside pour désigner la coque protéinique enfermant le matériel génétique viral. D'autre part, CASPAR et collaborateurs (1962) nomment nucléocapside l'ensemble formé par l'acide nucléique et la coque qui l'entoure. A la lumière des données, exposées ci-dessus, de l'ultrastructure et de la cytochimie des poxvirus de vertébrés et d'invertébrés, il semble que l'on puisse attribuer à la coque de nucléoïde la valeur d'une capside et à l'ensemble du contenu du nucléoïde et de sa coque celle d'une nucléocapside. Cette interprétation donnée par d'autres auteurs (EASTBROOK, 1966 ; SCHERRER, 1971) nous paraît satisfaisante.

II - COMPOSITION CHIMIQUE

A - Analyse globale

A la suite des travaux originaux de HOAGLAND, SMADEL, RIVERS et Coll. (HOAGLAND et al., 1940 a, b ; 1941 a, b ; SMADEL et al., 1940 ; SMADEL et HOAGLAND, 1942), plusieurs analyses chimiques détaillées de poxvirus de vertébrés ont été publiées (ZWARTOUW, 1964 ; JOKLIK, 1962a ; RANDALL et al., 1964). Selon ZWARTOUW (1964), la composition chimique du virion de la vaccine est de 91,8 % de protéines, 3,2 % d'ADN et 5 % de lipides dont 1,2 % de cholestérol, 2,1 % de phospholipides et 1,7 % de lipides neutres. Outre ces constituants majeurs, le virion renferme également des traces de glucides (0,2 %),d'ARN (0,1 %),de riboflavine, de biotine et de cuivre.

La composition chimique du virion du pox aviaire est nettement différente puisque la fraction lipidique représente 27,4 % du poids du virion, l'ADN ne représentant que 1,98 % de ce poids (RANDALL et al., 1964).

Chez les entomopoxvirus, il n'existe pas, à ce jour, d'analyse aussi détaillée. Les résultats de nos analyses indiquent un pourcentage d'ADN par rapport aux protéines nettement plus faible que chez les poxvirus de vertébrés : 2,21 % chez l'entomopoxvirus de *Melolontha* et seulement 1,38 % chez celui d'*Amsacta*. Nous avons discuté dans les chapitres précédents (section III C du chapitre II et sections III C et D du chapitre III) l'interprétation que l'on pouvait donner de ces résultats.

B - L'acide nucléique

Le génome des poxvirus est constitué d'une chaîne linéaire d'ADN bicaténaire dont le poids moléculaire est le plus élevé de tous ceux des acides nucléiques de virus connus à ce jour. Les mesures physiques et chimiques indiquent un poids moléculaire de 150×10^6 à 200×10^6 daltons pour une longueur de la chaîne comprise entre 80 et 100 µ (BECKER et SAROV, 1968 ; GAFFORD et RANDALL, 1967 ; HYDE et al., 1967 ; JACQUEMONT et al., 1972 ; JOKLIK, 1962b ; McCREA et LIPMAN, 1967 ; SAROV et BECKER, 1967).

Ainsi que nous l'avons précisé au chapitre III (section IIID), des molécules de cette taille sont difficiles à extraire et à conserver à l'état natif. Les difficultés que nous avons rencontrées dans nos essais d'isolement de l'ADN de l'entomopoxvirus d'*Amsacta* proviennent vraisemblablement du fait que le génome de ces virus est également de haut poids moléculaire.

Il est généralement admis que les traces d'ARN détectées dans les virions des poxvirus ne sont pas significatives et les auteurs s'accordent pour les considérer comme des contaminants (ALLISON et BURKE, 1962 ; JOKLIK, 1962 a et c ; PLANTEROSE et al., 1962 ; ZWARTOUW, 1964 ; JACQUEMONT et al., 1969).

C - Les protéines

Etant donné son haut poids moléculaire, l'ADN des poxvirus de vertébrés contient suffisamment d'information pour coder plusieurs centaines de protéines (JOKLIK, 1966). Par analogie avec ce que l'on connaît chez les bactériophages, en particulier chez le phage T 4 (EDGARD et al., 1964), il est à prévoir que seulement quelques unes de ces protéines entrent dans la constitution du virion, les autres assumant des fonctions catalytiques diverses au cours du cycle de réplication virale.

L'analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide de virions de la vaccine complètement dégradés en polypeptides s'avère fort complexe (HOLOWCZAK et JOKLIK, 1967a). Les électrophorégrammes indiquent la présence d'au moins 17 protéines dans le virion. Ces auteurs ont pu localiser ces protéines après dégradation des virions selon la technique d'EASTERBROOK (1966). L'action du détergent non ionique NP-40 seul libère une protéine majeure localisée à la surface ou près de la surface du virion. Le traitement des virions au NP-40 et au 2-mercaptoéthanol libère 14 protéines. Enfin, l'analyse de nucléoides isolés indique la présence de 3 protéines dans cette structure.

Outre ces polypeptides, le virion renferme également une glycoprotéine (HOLOWCZAK, 1970 ; GARON et MOSS, 1971) dont la fraction glu-

cidique (glucosamine) est vraisemblablement responsable des traces de glucides détectées lors de l'analyse globale du virion (ZWARTOUW, 1964) et une lipoprotéine dont la fraction lipidique (phospholipide) est essentiellement de la lécithine (DALES et MOSBACH, 1968).

La même complexité dans la composition en protéines semble prévaloir chez les entomopoxvirus comme l'indique l'analyse en gel de polyacrylamide de virions dissociés de l'entomopoxvirus d'*Amsacta* qui a permis d'identifier 16 à 17 protéines de structure (ROBERTS et McCARTHY, 1972).

Au cours de ces dernières années, plusieurs auteurs ont mis en évidence dans le nucléoïde de différents poxvirus de vertébrés 5 activités enzymatiques : une ARN polymérase ADN-dépendante, ou transcriptase (KATES et McAUSLAN, 1967a ; MUNYON et al., 1967 ; SCHWARTZ et DALES, 1971), une nucléotide phosphohydrolase (GOLD et DALES, 1968 ; MUNYON et al., 1968 ; SCHWARTZ et DALES, 1971), deux DNases, l'une neutre, l'autre acide (POGO et DALES, 1969a ; SCHWARTZ et DALES, 1971) et une protéine kinase (PAOLETTI et MOSS, 1972). Ces enzymes appartiennent au groupe des protéines "tardives" mais semblent jouer un rôle au cours des stades "précoces" de la réplication virale (voir plus loin, section IV de ce chapitre).

Nous avons pu caractériser 4 de ces activités enzymatiques chez l'entomopoxvirus d'*Amsacta* (voir section III E du chapitre III) et apporter ainsi une preuve supplémentaire de la ressemblance entre les poxvirus de vertébrés et d'insectes.

III - SEROLOGIE

On a coutume de distinguer chez les poxvirus deux catégories d'antigènes : les antigènes solubles présents dans les extraits de tissus infectés et les antigènes extraits des virions purifiés (APPLEYARD et ZWARTOUW, 1967).

A - Les antigènes solubles

L'analyse par micro-immunodiffusion en gel d'agarose d'extraits

préparés à partir de tissus infectés (membrane chorioallantoïdienne, peau de lapin grattée, tumeurs, culture de cellules) permet de déceler un nombre élevé d'antigènes lorsqu'on utilise des antisérums hyperimmuns homologues. C'est ainsi que 17 lignes de précipitation sont produites par les antigènes solubles de virus de la vaccine (WESTWOOD et al., 1965) et du virus de la tumeur Yaba (OLSEN et YOHN, 1970) et 20 par ceux du rabbit pox (APPLEYARD et WESTWOOD, 1964). RODRIGUEZ-BURGOS et Coll. (1966) ont également identifié par la méthode d'immunoélectrophorèse 17 antigènes solubles dans des extraits de membranes chorioallantoïdiennes infectées par le virus vaccinal.

Parmi les antigènes solubles, il en est un dont l'injection à des lapins induit la formation d'un anticorps neutralisant et confère une certaine immunité aux animaux inoculés (APPLEYARD, 1961 ; APPLEYARD et WESTWOOD, 1964). Cet antigène "protecteur" ("protective antigen") est une protéine de poids moléculaire compris entre 100.000 et 200.000 (APPLEYARD et al. 1964).

B - Les antigènes extraits des virions purifiés

L'analyse des antigènes de structure des virions est aussi complexe que l'analyse chimique de leurs protéines. La technique de microimmunodiffusion est la plus couramment utilisée dans les travaux récents sur ces antigènes. Du fait de leur grande taille, les virions doivent être dégradés préalablement à leur analyse. La dégradation du virus de la vaccine par traitement alcalin doux, digestion à la trypsine ou autodégradation à 37°C pendant 3 jours permet d'identifier, dans les trois cas, 8 lignes de précipitation en utilisant des antisérums homologues préparés à partir de virions entiers ou partiellement solubilisés (ZWARTOUW et al., 1965). Ces antigènes représentent pondéralement 20 % seulement des protéines virales mais une dégradation plus poussée du virion n'augmente pas le nombre de lignes de précipité.

La dégradation mécanique ("X-press") des virions de la tumeur Yaba libère 5 antigènes décelables en immunodiffusion et l'hydrolyse du résidu par le SLS, l'urée et le 2-mercaptoéthanol permet d'identifier 4 lignes de précipités supplémentaires (OLSEN et YOHN, 1970).

A cette catégorie d'antigènes appartient l'antigène "NP" commun à tous les poxvirus de vertébrés (WOODROOFE et FENNER, 1962). Cet antigène, obtenu par hydrolyse des virions dans la soude normale à 56°C pendant 15 minutes, contient l'ADN viral, d'où son nom d'"antigène nucléoprotéine" ("NP"). ZWARTOUW et Coll. (1965) ont montré que cet antigène est en fait un mélange de plusieurs antigènes contenus à l'intérieur du virion et que l'on peut extraire, par un traitement plus ménagé, sans libérer l'acide nucléique.

C - Relations sérologiques entre antigènes solubles et antigènes extraits des virions purifiés

Si l'on compare les antigènes de structure du virion de la vaccine à ceux contenus dans les extraits cellulaires (antigènes solubles) à l'aide d'antisérums hyperimmums, on constate que seul un petit nombre d'antigènes des deux groupes forment des arcs de précipitation communs. Ce sont les arcs mineurs qui donnent de telles réactions, les arcs majeurs d'antigènes solubles ne correspondant à aucun antigène de structure (ZWARTOUW et al., 1965). L'emploi d'antisérums préparés contre les antigènes de structure ou les antigènes solubles confirment l'existence de différences importantes entre ces deux groupes d'antigènes. De même, aucun antigène de structure du virion Yaba ne peut être mis en évidence par immunodiffusion dans les préparations d'antigènes solubles extraits des tumeurs en employant du fréon (OLSEN et YOHN, 1970). Les antisérums préparés contre des antigènes solubles extraits sans fréon donnent 5 lignes de précipités avec les antigènes de structure.

Ces résultats indiquent clairement la présence dans les cellules infectées par les poxvirus de plusieurs antigènes solubles distincts des antigènes de structure. Ces antigènes correspondent vraisemblablement aux enzymes codées par le génome viral.

D - Relations sérologiques entre poxvirus de vertébrés

Les relations sérologiques entre différents agents du groupe des poxvirus de vertébrés ont été étudiées par un grand nombre de techniques

immunologiques : la fixation du complément, l'immunodiffusion, la réaction d'inhibition d'hémagglutination, les tests de neutralisation, de formation des plages ou de "pustules", les colorations à l'aide d'anticorps couplés à la fluorescéine. Il existe des relations sérologiques étroites entre les virus du sous-groupe de la vaccine, du cowpox, du rabbit pox et de l'ectromélie d'une part et les virus du sous-groupe myxome-fibrome de l'autre (WOODROOFE et FENNER, 1962). Aucune communauté antigénique entre ces deux sous-groupes ni entre l'un d'eux et le virus de la variole aviaire ou celui de la tumeur Yaba n'a pu être mise en évidence par ces auteurs. Toutefois, les antisérums préparés contre des extraits alcalins du virus de la vaccine et du rabbit pox contenant le complexe antigénique "NP", réagissent avec le complexe antigénique "NP" de tous les poxvirus essayés (WOODROOFE et FENNER, 1962). Ce complexe contient donc un ou plusieurs antigènes communs à tous les poxvirus de vertébrés.

E - Relations sérologiques entre poxvirus de vertébrés et d'invertébrés

A ce jour, et à notre connaissance, les entomopoxvirus n'ont fait l'objet d'aucune étude détaillée de leurs propriétés sérologiques. Au cours d'essais préliminaires (non rapportés dans ce travail) de comparaison en immunodiffusion des antigènes du virus de la vaccine, d'une part, et des entomopoxvirus de *Melolontha* et d'*Amsacta*, d'autre part, nous n'avons pu mettre en évidence aucune communauté antigénique. Le titre des antisérums préparés contre les entomopoxvirus est toujours très faible et ces résultats préliminaires ne permettent pas de conclure à l'absence de relation sérologique entre poxvirus de vertébrés et d'invertébrés. Nous espérons pouvoir résoudre dans un avenir proche cette importante question.

IV - CYCLE DE REPLICATION VIRALE

La séquence des étapes du cycle de réplication des poxvirus, depuis la pénétration des virions dans la cellule hôte jusqu'au rejet dans le milieu extérieur des virions néoformés, est connue avec une grande précision. Cette analyse poursuivie depuis plusieurs années, tant sur le plan de la biochimie que celui de la microscopie électronique, a permis d'établir

d'étroites corrélations entre les données de ces deux disciplines. Il convient de préciser, avant l'exposé de ce cycle, qu'une telle analyse n'a été possible que grâce à l'utilisation de cultures *in vitro* de lignées cellulaires parfaitement synchrones, elles-mêmes infectées de façon synchrone. Il est en effet essentiel, pour une analyse chronologique précise, que les cellules hôtes soient dans un même état physiologique au moment de l'infection et que cette dernière ait lieu de telle sorte que toutes les cellules soient infectées en même temps.

A - Pénétration des virions

Le cycle de réplication des poxvirus tel qu'il a été établi par DALES et collaborateurs en prenant comme modèle le virus vaccinal (Pl. LVIII, Fig. 182), commence par la pénétration des virions dans les cellules. Les virions s'adsorbent sur la membrane cellulaire et pénètrent dans le cytoplasme par un processus de phagocytose (DALES et SIMINOVITCH, 1961 ; DALES, 1963, 1965a ; DALES et KAJIOKA, 1964). Les virions enfermés dans des vésicules phagocytaires sont transportés à l'intérieur du cytoplasme et subissent une dégradation de leur enveloppe aboutissant à la libération de leur nucléoïde. Ces derniers sortent des vésicules phagocytaires et se retrouvent libres dans le cytoplasme (Pl. LVI, Fig. 175). Ces évènements se produisent entre 30 et 60 minutes après l'infection.

Sur le plan biochimique, cette première étape se traduit par la libération dans le cytoplasme de la fraction phospholipidique du virion dont on sait qu'elle est contenue presque exclusivement dans l'enveloppe (DALES et MOSBACH, 1968). Il en est de même de certaines protéines de structure, comme l'a montré JOKLIK (1962c, 1964a) en infectant des cellules avec des virions marqués par des isotopes radioactifs.

La pénétration des virions telle qu'elle a lieu *in vivo* peut être simulée *in vitro* par la dégradation contrôlée selon la technique d'EASTERBROOK (1966), de virions purifiés. Après déchirure de l'enveloppe lipoprotéinique, les corps latéraux peuvent être digérés spécifiquement par la trypsine (Pl. LIII, Fig. 167 et 168). POGO et DALES (1969a) ont montré que l'activité des deux DNases, l'une acide, l'autre neutre, contenues dans le nucléoïde

du virion de la vaccine était considérablement augmentée après digestion des corps latéraux. Ces résultats suggèrent que ces structures contiennent un inhibiteur des DNases. Il est intéressant de noter, à cet égard, que dans les cellules les corps latéraux se séparent du nucléoïde au moment même où les virions s'échappent des vésicules phagocytaires (DALES, 1963). Cette dissociation pourrait ainsi correspondre au mécanisme naturel d'activation des DNases.

La première étape de pénétration des virions n'a jamais été reconnue dans les cellules adipeuses infectées de *Melolontha*. Nous avons par contre observé assez régulièrement dans les hémocytes prélevés dès la douzième heure après l'infection, des virions phagocytés et des nucléoïdes libres dans le cytoplasme (DEVAUCHELLE et al., 1971). De même, GRANADOS et ROBERTS (1970) ont observé des nucléoïdes libres de l'entomopoxvirus d'*Amsacta* dans les cellules adipeuses. La pénétration des virions et la libération du nucléoïde s'opèrent donc de la même façon chez les entomopoxvirus que chez les poxvirus de vertébrés.

B - Début des synthèses virales

Au cours de la deuxième étape du cycle de réplication, des molécules d'ARN messagers sont transcrites de l'ADN encore enfermé dans le nucléoïde, par la transcriptase (ARN polymérase ADN dépendante), et déversées dans le cytoplasme (KATES et McAUSLAN, 1967b ; WOODSON, 1967 ; KATES et BEESON, 1970 ; MUNYON et KIT, 1966). La nucléotide phosphohydrolase également présente dans le nucléoïde pourrait jouer un rôle dans le transfert des ARN messagers du nucléoïde dans le cytoplasme (KATES et BEESON, 1970). Un des ARN transcrit de la sorte serait celui codant la synthèse de la protéine de dissociation du nucléoïde ("uncoating protein"). On sait en effet que cette protéine est nécessaire pour l'ouverture de la coque du nucléoïde, permettant ainsi au génome parental d'être libéré dans le cytoplasme (JOKLIK, 1964b). Ces synthèses ont lieu dans l'heure qui suit l'apparition des nucléoïdes libres.

Dès que l'ADN commence à être libéré, un certain nombre d'ARN messagers sont traduits du matériel génétique parental (BECKER et JOKLIK,

1964 ; JOKLIK et BECKER, 1965 ; SALZMAN et al., 1964 ; ODA et JOKLIK, 1967 ; SEBRING et SALZMAN, 1967). Ces ARN messagers codent la synthèse de protéines enzymatiques et de différentes protéines de structure. Parmi les enzymes ainsi synthétisées on a identifié une thymidine kinase (KIT et al., 1962 ; McAUSLAN et JOKLIK, 1962 ; JUNGWIRTH et JOKLIK, 1965), une DNA polymérase (GREEN, 1962 ; GREEN et al., 1964 ; JUNGWIRTH et JOKLIK, 1965 ; MAGEE et MILLER, 1967 ; CHANG et HODES, 1967) et deux DNases (McAUSLAN, 1965 ; McAUSLAN et KATES, 1967). Quant aux protéines de structure, leur apparition a été suivie en fonction du temps par des techniques immunologiques et biochimiques (APPLEYARD et al., 1965 ; SHATKIN, 1963 ; SALZMAN et SEBRING, 1967 ; WILCOX et COHEN, 1967 ; COHEN et WILCOX, 1966 ; MOSS et KATZ, 1969 ; HOLOWCZAC et JOKLIK, 1967b). Toutes ces protéines, y compris le facteur de dissociation du nucléoïde, codées par le génome parental, sont qualifiées de "précoces" par opposition aux protéines "tardives" codées par des ARN messagers transcrits à partir de l'ADN néoformé. Leur synthèse est en effet possible en l'absence de toute réplication de l'ADN comme l'ont montré, à l'aide d'inhibiteurs spécifiques, plusieurs des auteurs cités ci-dessus.

La réplication de l'ADN viral débute environ 1 heure 1/2 après l'infection, elle atteint son maximum environ une heure plus tard et cesse presque entièrement au bout de 5 heures (SALZMAN, 1960 ; SALZMAN et al., 1962, 1963 ; JOKLIK et BECKER, 1964). Elle se produit dans des foyers intracytoplasmiques discrets auxquels viennent s'incorporer les protéines virales (CAIRNS, 1960 ; MAGEE et al., 1960 ; LOH et RIGS, 1961 ; HARFORD et al., 1966). Ainsi apparaissent les viroplasmes (DALES et SIMINOVITCH, 1961 ; DALES, 1963 ; KAJIOLA et al., 1964) dont la taille augmente progressivement par l'accumulation de produits de la synthèse virale.

Chez l'entomopoxvirus de *Melolontha* nous avons reconnu de façon certaine, dans le cytoplasme des cellules hémocytaires, la phase d'ouverture des nucléoïdes avec l'apparition des premiers foyers de synthèse virale, probablement l'ADN répliqué (DEVAUCHELLE et al., 1971). Des amas de matériel dense comparables aux viroplasmes des poxvirus de vertébrés sont, d'autre part, abondants dans les cellules adipeuses et sanguines. Il apparaît donc que les phases initiales de la réplication de ce virus, au moins sur le plan ultrastructural, sont identiques à celles décrites chez les poxvirus de vertébrés.

C - Morphogénèse virale

Environ 3 heures après l'infection, des enveloppes virales apparaissent dans le matériel viroplasmique. La première évidence de la formation des membranes est l'apparition de courts segments en forme d'arc constitués d'une membrane unitaire recouverte d'une couche de spicules (Pl. LVI, Fig. 178) (DALES et SIMINOVITCH, 1961 ; DALES et MOSBACH, 1968). Ces membranes se développent en conservant cette courbure de telle sorte qu'elles se referment progressivement sur elles-mêmes en englobant la substance fondamentale du viroplasme et donnent naissance à des particules immatures sphériques.

Le mode de formation tout à fait original de ces enveloppes exclut qu'elles puissent provenir de structures membranaires préexistantes dans la cellule hôte (DALES et MOSBACH, 1968). Les poxvirus diffèrent en cela de nombreux virus d'animaux et de plantes, tels les virus de l'influenza, les rhabdovirus ou les arbovirus, qui acquièrent leur enveloppe à partir de portions modifiées de membranes cellulaires (voir discussion dans DALES, 1965b). Il s'agit en fait de structures formées *de novo* à partir de l'information génétique virale. L'enveloppe des poxvirus présente plusieurs des caractéristiques des membranes cellulaires, en particulier une structure trilamellaire de même épaisseur et une composition chimique dans laquelle entrent des protéines, des lipides et des glycoprotéines.

Des expériences mettant en jeu des inhibiteurs de la synthèse et de la transcription de l'ADN montrent que la synthèse des protéines participant à la formation de l'enveloppe appartient à la catégorie des fonctions "précoces" et commence environ 2 heures 1/2 après l'infection (ROSENKRANZ et al., 1966 ; DALES et MOSBACH, 1968 ; NAGAYAMA et al., 1970). L'assemblage des particules virales immatures est un processus continu et exponentiel durant 10 heures et plus. Au cours de ce processus, les particules sont formées à partir d'un pool croissant de protéines virales intracytoplasmiques.

D'après la reconstitution de la séquence des étapes de la morphogénèse, il apparaît que tous les poxvirus subissent une différenciation pour passer du stade de particule immature sphérique à celui du virion mûr, par une succession de modifications se produisant à l'intérieur de l'enveloppe virale

(DALES et MOSBACH, 1968). Un stade précoce de différenciation est représenté par l'apparition à l'intérieur des particules sphériques d'un nucléoïde discret constitué de faisceaux de filaments denses d'ADN, de 20-25 Å de diamètre (Pl. LVI, Fig. 177). Dans certaines formes de transition, on observe la condensation des corps latéraux ainsi que l'organisation de la coque du nucléoïde (Pl. LVI, Fig. 178). Lorsque les particules ont atteint ce stade, elles s'éloignent des aires viroplasmiques et subissent éventuellement des modifications en vue de leur expulsion des cellules.

Parallèlement à la réplication de l'ADN, un certain nombre de protéines structurales complémentaires sont synthétisées (SALZMAN et SEBRING, 1967 ; JOKLIK et al., 1967 ; HOLOWCZAK et JOKLIK, 1967b ; KATZ et MOSS, 1970 a et b). Les ARN messagers qui les codent sont transcrits de l'ADN néoformé et appartiennent donc à la catégorie des messagers "tardifs". Ils se distinguent des messagers "précoces" par une plus grande longueur et une stabilité moindre (BECKER et JOKLIK, 1964 ; WOODSON et JOKLIK, 1965 ; ODA et JOKLIK, 1967 ; SEBRING et SALZMAN, 1967). Ces protéines ont un rôle essentiel dans les processus de maturation des particules virales. L'inhibition de leur synthèse conduit en effet à l'accumulation dans le cytoplasme de particules immatures (EASTERBROOK, 1962 ; MOSS et al., 1969 ; ROSENKRANZ et al., 1966 ; GRIMLEY et al., 1970 ; GRIMLEY et MOSS, 1971 ; POGO et DALES, 1971 ; NAGAYAMA et al., 1970 ; PENNINGTON et FOLLET, 1971). A cette catégorie des protéines tardives appartiennent les enzymes présentes dans le nucléoïde (KATES et al., 1968 ; McAUSLAN et KATES, 1967 ; POGO et DALES, 1969b). Certaines d'entre elles joueraient un rôle essentiel dans la maturation des particules comme l'ont montré récemment DALES et ses collaborateurs (POGO et DALES, 1969b ; POGO et DALES, 1971 ; NAGAYAMA et al., 1970).

La morphogénèse de l'entomopoxvirus de *Melolontha* telle que nous l'avons étudiée sur coupes fines de tissu adipeux, apparaît fort complexe. C'est ainsi que nous avons décrit 5 types différents de particules immatures, présentant des degrés divers d'organisation (voir chapitre II, section IV B et Pl. XVII, Fig. 86-91). La ressemblance entre la plupart des stades de morphogénèse de ce virus et ceux décrits chez les poxvirus de vertébrés (Pl. LVI) est évidente (DALES, 1963 ; DALES et SIMINOVITCH, 1961 ; PETERS, 1958 ; MORGAN et al., 1954 ; GAYLORD et MELNICK, 1953 pour le virus

de la vaccine ; MORGAN et al., 1954 ; ARHELGER et RANDALL, 1964 ; ARHELGER et al., 1962 ; CHEVILLE, 1966 pour le virus de la variole aviaire ; BANFIELD et al., 1952 ; BANFIELD et BRINDLEY, 1959 ; BIERWOLF et al., 1968 ; GAYLORD et MELNICK, 1954 ; CHARLES, 1960 ; DOURMASHKIN et DUPERRAT, 1958 ; DOUMARSHKIN et BERNHARD, 1959 pour le virus du *Molluscum contagiosum* ; MATSUMOTO, 1958 ; HIGASHI et al., 1960 ; LEDUC et BERNHARD, 1962 ; ROHER et HOFFMANN, 1960 pour le virus de l'ectromélie ; BERNHARD et al., 1954 ; FEBVRE et al., 1957 ; FEBVRE, 1962 ; SCHERRER, 1968 pour le virus du fibrome de Shope ; de HARVEN et YOHN, 1964, 1966 ; CASEY et al., 1967 pour le virus de la tumeur Yaba ; COHEN et al., 1971 pour le virus de la clavelée ; AVAKYAN et BYCKOVSKY, 1965 pour le virus de la variole humaine).

Sur la base de ces ressemblances morphologiques, nous avons proposé une chronologie possible des étapes de la morphogénèse de ce virus se superposant assez bien à celle,connue,des poxvirus de vertébrés. Il apparaît ainsi que, dans ses grandes lignes, l'assemblage des constituants viraux en particules immatures sphériques d'une part, la maturation de ces formes en virions complets de l'autre, s'effectuent chez ce virus selon un schéma comparable à celui décrit de nombreuses fois chez les poxvirus de vertébrés. L'observation chez d'autres entomopoxvirus de formes immatures morphologiquement comparables (voir chapitre IV) permet d'envisager pour l'ensemble des virus de ce groupe un mode semblable de morphogénèse.

Nos observations indiquent toutefois que la morphogénèse des entomopoxvirus présente certaines particularités par rapport à celle des poxvirus de vertébrés. La première concerne la structure de l'enveloppe des formes immatures. Chez les poxvirus de vertébrés, cette enveloppe est constituée d'une membrane unitaire interne et d'une couche externe de spicules (DALES et SIMINOVITCH, 1961 ; DALES et MOSBACH, 1968 ; de HARVEN et YOHN, 1966 ; HIGASHI et al., 1960 ; PATTRIZI et MIDDELKAMP, 1968 ; COHEN et al., 1971). Selon SCHERRER (1971) les sous-unités recouvrant la membrane unitaire ne sont pas spiculaires chez le virus du fibrome de Shope mais tubulaires. Chez les formes immatures de l'entomopoxvirus de *Melolontha*, si la membrane unitaire interne de l'enveloppe s'observe nettement, nous n'avons, par contre, jamais pu résoudre la structure de la couche externe en sous-unités. Celle-ci apparaît généralement formée par un matériel dense et amorphe,

plaquée contre la membrane (Pl. XXVI, Fig. 82). Chez les formes immatures de l'entomopoxvirus d'*Amsacta*, cette enveloppe serait constituée de deux membranes unitaires superposées (GRANADOS et ROBERTS, 1970). Seules les formes immatures de l'entomopoxvirus de *Chironomus attenuatus* semblent posséder une couche de spicules à la surface de leur enveloppe (STOLTZ et SUMMERS, 1972). Ces différences sont intéressantes à deux points de vue. D'une part, l'attachement à la membrane unitaire de sous-unités est considéré chez les poxvirus de vertébrés comme un facteur essentiel du maintien de la rigidité des enveloppes (DALES et MOSBACH, 1968 ; SCHERRER, 1971). L'absence apparente de ces sous-unités chez la plupart des entomopoxvirus suggère que la rigidité des enveloppes est réalisée par un processus différent d'assemblage de leurs constituants. Il n'est toutefois pas exclu que ces sous-unités existent et que nous ne les ayions pas vues. D'autre part, il est possible que l'ornementation de surface des virions dérive d'une manière ou d'une autre de la couche externe de l'enveloppe des formes immatures. Les différences que nous venons de mentionner pourraient bien être à l'origine de celles que nous avons constatées en comparant l'ornementation de surface des entomopoxvirus et des poxvirus de vertébrés (voir section I B de ce chapitre).

L'élaboration des enveloppes virales chez l'entomopoxvirus de *Melolontha* se produit soit au contact direct des masses viroplasmiques, soit dans des aires cytoplasmiques proches mais d'opacité aux électrons beaucoup plus faible. Dans le premier cas, les enveloppes encerclent le matériel viroplasmique et les particules sphériques ainsi formées ont une forte opacité aux électrons. Les particules produites dans le second cas paraissent vides mais la présence de nombreuses formes de transition suggère qu'elles évolueraient en particules denses. Ce phénomène se produit aussi bien dans les cellules adipeuses que dans les hémocytes (DEVAUCHELLE et al., 1971). Les particules creuses sont généralement associées à des éléments vésiculaires plus ou moins refermés sur eux-mêmes et constitués d'une membrane unitaire. Ces vésicules s'observent à l'intérieur des sphères dans le cytoplasme environnant ou en continuité avec la membrane unitaire des enveloppes incomplètes, suggérant leur participation dans l'élaboration de ces structures.

Des images de vésicules tout à fait semblables, en continuité avec la membrane unitaire de l'enveloppe, ont été décrites lors de l'étude

de la morphogénèse de certains poxvirus de vertébrés à développement relativement lent, comme le virus de la tumeur Yaba (TSURUHARA, 1971), de la variole ovine (COHEN et al., 1971) ou le virus du fibrome de Shope (SCHERRER, 1971). Par contre, ces vésicules n'apparaissent dans les cellules infectées par le virus vaccinal qu'après traitement par l'actinomycine D ou la rifampicine (DALES et MOSBACH, 1968 ; NAGAYAMA et al., 1970 ; GRIMLEY et al., 1970 ; PENNINGTON et al., 1970). De même, ces vésicules sont beaucoup plus fréquentes lorsque la morphogénèse du virus du fibrome de Shope a lieu à température supraoptimale (SCHERRER, 1971). Ces observations sont interprétées soit comme le fait d'une membranogénèse aberrante (DALES et MOSBACH, 1968 ; NAGAYAMA et al., 1970), soit comme le résultat d'une accumulation dans le cytoplasme de précurseurs de l'enveloppe virale, par suite d'un blocage ou d'une dissociation des processus d'assemblage de ses constituants (GRIMLEY et al., 1970 ; PENNINGTON et al., 1970 ; SCHERRER, 1971 ; COHEN et al., 1971).

Il ressort de ces observations que la formation de la membrane unitaire de l'enveloppe s'opère vraisemblablement de la même manière chez tous les poxvirus de vertébrés, par l'adjonction successive de petits fragments, mais que dans des conditions "normales" de développement, ce processus ne s'observe que chez les virus dont la morphogénèse est relativement lente.

Chez l'entomopoxvirus de *Melolontha*, l'élaboration de cette membrane à partir des vésicules semble correspondre également à un processus normal de morphogénèse en ce sens qu'il se produit en l'absence de tout traitement particulier. Bien que nous n'ayions aucune donnée précise sur la durée d'un cycle complet de formation des virions, la lenteur d'évolution de la maladie, même après infection avec un nombre élevé de particules infectieuses, laisse à penser que la morphogénèse est elle-même lente. L'assemblage des constituants de l'enveloppe serait donc un phénomène relativement facile à saisir en étude ultrastructurale. Il est cependant étonnant que nous ne l'ayions jamais observé pour les enveloppes se formant au contact direct des viroplasmes. Toute tentative d'interprétation de ces observations apparemment contradictoires serait purement spéculative dans l'état actuel de nos connaissances. Nous pensons que seule une analyse séquentielle précise

de la morphogénèse de ce virus, dans un système cellulaire *in vitro* approprié, permettra d'apporter une réponse satisfaisante à ces questions.

Les amas de substance d'opacité moyenne aux électrons observés dans les aires de morphogénèse de l'entomopoxvirus de *Melolontha* rappellent, tant par leur aspect que leur substructure, ceux décrits par de HARVEN et YOHN (1966) dans les cellules tumorales de singe infectées par le virus Yaba. De même, des structures lamellaires analogues à celles que nous avons rencontrées dans les cellules adipeuses infectées de *Melolontha* ont été décrites associées aux viroplasmes de plusieurs poxvirus de vertébrés dont ceux de l'ectromélie (MATSUMOTO, 1958 ; LEDUC et BERNHARD, 1962 ; ROHER et HOFFMAN, 1960 ; SIEGEL, 1960), de la variole aviaire (CHEVILLE, 1966 ; GREGOIRE et al., 1962) et du fibrome de Shope (BERNHARD et al., 1954 ; SCHERRER, 1958). Ces deux types de formations sont interprétés comme une accumulation anormale de ces constituants, du fait de l'identité de structure des sous-unités qui les composent et de celles recouvrant la membrane unitaire virale (de HARVEN et YOHN, 1966 ; SCHERRER, 1968). Etant donné que chez l'entomopoxvirus de *Melolontha* aucun lien évident ne peut être établi entre ces structures et la morphogénèse virale, leur signification demeure obscure.

D - Dissémination des virions néoformés

On connaît, chez les poxvirus de vertébrés, deux modes distincts de dissémination des virions néoformés. Dans un premier cas, comme par exemple chez le virus de la vaccine, les virions entrent en contact avec des vésicules cytoplasmiques d'origine golgienne qui fusionnent pour former une citerne continue à double membrane entourant la particule virale (Pl. LVI, Fig. 179) (DALES et SIMINOVITCH, 1961). Les virions ainsi enveloppés migrent vers la surface des cellules. La paroi externe de la citerne fusionne alors avec la membrane plasmique, créant ainsi une ouverture par où s'échappe le virion (Pl. LVI, Fig. 180). La membrane interne de la citerne peut se rompre à son tour, libérant les virions nus dans le milieu extra cellulaire. Dans certains cas, les particules virales ne s'entourent pas de vésicules golgiennes mais migrent directement à la surface des cellules. Au contact du virion, la membrane plasmique se modifie par acquisition d'un antigène viral (ICHIHASHI et al., 1971). Ces modifications de la membrane

plasmique rappellent celles observées dans les cellules infectées par des virus des groupes Herpes, Myxovirus et Paramyxovirus (voir discussion dans DALES, 1965b ; FENNER, 1968 ; ICHIHASHI et al., 1971).

Le deuxième mode de dissémination est tout à fait différent. Il consiste en l'incorporation des virions néoformés dans des inclusions appelées inclusions de type A ou encore corps de DOWNIE, de BOLLINGER ou de MARCHAL (MATSUMOTO, 1956 ; KATO et al., 1955, 1963 ; ARHELGER et al., 1962). Ces inclusions sont connues seulement pour certains agents de ce groupe : le virus de la variole bovine (cowpox), de l'ectromélie, de la variole aviaire et du myxome. Leur structure finement granuleuse est homogène chez le virus de l'ectromélie et celui de la variole bovine et leur nature est protéinique (Pl. LVII, Fig. 181) (ICHIHASHI et MATSUMOTO, 1966 ; ICHIHASHI et al., 1971). Chez le virus de la variole aviaire (fowlpox), les inclusions de type A ont une texture plus grossière et sont constituées essentiellement de lipides (RANDALL et GAFFORD, 1962 ; ARHELGER et al., 1962 ; RANDALL et al., 1964).

La synthèse de ces inclusions est sous le contrôle de l'information génétique virale. Le caractère présence ou absence d'inclusions est appelé facteur V (ICHIHASHI et MATSUMOTO, 1968). Dans certaines souches du virus de l'ectromélie et de la variole bovine, les virions sont incorporés à l'intérieur des inclusions (V^+) alors que, dans d'autres, ces inclusions sont produites mais n'incluent pas de virions (V^-) (MATSUMOTO, 1958 ; KATO et al., 1963 ; ICHIHASHI et MATSUMOTO, 1966). L'infection double de cellules avec des souches V^+ et V^- de la variole bovine conduit à la formation d'un seul type d'inclusions dans lesquels les virions des deux souches sont inclus. Le caractère V^+ est donc dominant. D'autre part, l'infection double de cellules avec une souche V^- de variole bovine et la souche IHD de la vaccine ne produisant pas d'inclusions, aboutit également à l'incorporation des virus des deux souches dans les inclusions qui se forment. Le génome de cette souche de virus vaccinal contient donc l'information nécessaire à l'incorporation des virions dans les inclusions, bien qu'il ne possède pas celle permettant la synthèse de la protéine d'inclusion. On a donc affaire à deux gènes, l'un déterminant la capacité d'incorporer des virions dans l'inclusion, l'autre déterminant la possibilité de synthétiser la substance de l'inclusion.

ICHIHASHI et Coll. (1971) ont montré, à l'aide de différents inhibiteurs métaboliques, que la formation des inclusions appartient à la catégorie des fonctions tardives pour lesquelles la régulation des synhtèses s'effectue de façon distincte de celle liée à la biogénèse des virions.

Les deux modes de dissémination des virions que nous venons de considérer se retrouvent chez l'entomopoxvirus de *Melolontha*. Dans les cellules adipeuses, le processus d'enveloppement des virions dans des membranes cytoplasmiques et de rejet dans les espaces intercellulaires semble limité et doit vraisemblablement intervenir dans la propagation de l'infection d'une cellule à l'autre. La plupart des virions néoformés sont incorporés dans les sphérules qui apparaissent comme l'équivalent des inclusions de type A des poxvirus de vertébrés. Toutefois, la cohésion des sphérules est beaucoup plus grande que celle des inclusions de vertébrés qu'un traitement ménagé aux ultrasons suffit à dissocier (ICHIHASHI et MATSUMOTO, 1968). A la mort de l'insecte, les sphérules sont rejetées dans le sol et du fait de leurs propriétés chimiques et mécaniques remarquables, elles assurent une protection efficace des virions qu'elles contiennent. Ces inclusions représentent ainsi une forme de dissémination des virus dans la nature particulièrement efficace dont la résistance est comparable à celle des spores des bactéries, des champignons ou de certains protozoaires.

A l'inverse de la situation observée dans les cellules adipeuses, la plupart des virions synthétisés dans les cellules sanguines sont rejetés dans le milieu extérieur par un processus d'exocytose. La formation de sphérules est exceptionnelle dans ces cellules (DEVAUCHELLE et al., 1971).

Les différentes étapes du cycle de réplication de l'entomopoxvirus de *Melolontha*, que nous avons pu reconstituer à partir de l'examen au microscope électronique de cellules adipeuses et sanguines, sont représentées de façon schématique sur la figure 183 (Pl. LIX).

La dissémination de virions libres a été signalée seulement chez un autre entomopoxvirus, celui de *Chironomus attenuatus* (STOLTZ et SUMMERS, 1972), bien que ce processus doive vraisemblablement se produire dans d'autres cas. Par contre, on retrouve pour tous ces virus la formation

d'inclusions de type sphérules, indiquant qu'il s'agit là d'une propriété commune à ces différentes souches.

V - CONCLUSIONS

Un certain nombre de conclusions se dégagent de l'étude comparée des poxvirus de vertébrés et d'invertébrés. Sur le plan de la morphologie et de la structure, nous pouvons conclure à une remarquable ressemblance entre l'architecture d'un poxvirus de vertébré et celle d'un entomopoxvirus. On retrouve en effet chez ces derniers les trois constituants de base d'un poxvirus : l'enveloppe, les corps latéraux et le nucléoïde. Ce type d'architecture ne se retrouve chez les virions d'aucun autre groupe de virus et confère aux poxvirus une grande originalité dans le monde viral.

L'examen détaillé des constituants du virion fait cependant apparaître des différences suffisantes pour distinguer les poxvirus d'invertébrés de ceux des vertébrés. Ces différences intéressent à la fois la taille, la forme, l'ornementation de surface et l'organisation interne du virion (voir tableau XV, page 164). C'est ainsi, qu'en règle générale, les entomopoxvirus sont de forme ovoïde et de taille plus grande que les poxvirus de vertébrés. Les entomopoxvirus de diptères, de forme cuboïdale et de petite taille, font exception et se rapprochent ainsi des poxvirus de vertébrés. Les éléments globuleux de la surface des entomopoxvirus diffèrent assez sensiblement des rides ou de la structure filamenteuse qui ornent l'enveloppe des poxvirus de vertébrés. Enfin, les entomopoxvirus montrent une plus grande diversité dans l'organisation de leur structure interne. Ce dernier point permet de distinguer, au sein des entomopoxvirus, trois grands types : le type entomopoxvirus de Coléoptères à nucléoïde unilatéralement concave et corps latéral unique, le type entomopoxvirus de Lépidoptères et d'Orthoptères, à nucléoïde cylindrique ou faiblement biconcave flanqué de deux corps latéraux discrets et le type entomopoxvirus de Diptères, à nucléoïde biconcave et corps latéraux développés.

L'analyse chimique partielle des virions de l'entomopoxvirus de *Melolontha* et de ceux de l'entomopoxvirus d'*Amsacta* a montré que leur

Tableau XV

CARACTERISTIQUES DES VIRIONS DE POXVIRUS DE VERTEBRES ET D'INVERTEBRES

		Dimension (nm) et forme	Aspect de la surface	Structure interne (section longitudinale)		Acide nucléique (%)
				nucléoïde	corps latéraux	
POXVIRUS DE VERTEBRES	Sous-Groupe vaccine Virus vaccinal	300 x 240 parallélépipèdique à contours émoussés formes "M" et "C" (Réf. 1, 2, 3)	rides ou cannelures sans disposition régulière (150 Å de large) (Réf. 2, 4, 5, 6, 7)	biconcave, contient un filament de 400-500 Å de diamètre (3 éléments : "triplet"). (Réf. 3, 6, 8, 9, 10)	deux corps lenticulaires développés (Réf. 3)	ADN 3,2-5 (Réf. 11,12)
	Sous-groupe paravaccine Virus de l'ecthyma contagieux	260 x 160 ovoïde formes "M" et "C" (Réf. 1, 13)	filament unique disposé en spirale régulière (100-120 Å de diamètre) (Réf. 1, 13, 14, 15)	biconcave, contient un filament de 300 Å de diamètre (3 éléments) (Réf. 14, 15)	deux corps lenticulaires moins développés que chez le virion vaccinal (Réf. 14)	ADN 7,7 (Réf. 13)
POXVIRUS D'INVERTEBRES	Entomopoxvirus de Coléoptères Virus *Melolontha*	450 x 250 ovoïde formes "M" et "C" (Réf. 16, 17, 18, 19, 20)	aspect de mûre, éléments globuleux de 220 Å de diamètre, sans disposition régulière (Réf. 17, 18, 20)	unilatéralement concave, contient un filament de 200 Å de diamètre (4 à 5 éléments) (Réf. 19, 20)	un seul corps lenticulaire volumineux (Réf. 19, 20)	ADN 2,2 (Réf. 21)
	Entomopoxvirus de Lépidoptères Virus *Amsacta*	350 x 250 ovoïde formes "M" et "C" (Réf. 22)	aspect de mûre, éléments globuleux de 400 Å de diamètre, sans disposition régulière (Réf. 22)	rectangulaire, contient un filament de 300 Å de diamètre (1 à 5 éléments) (Réf. 22)	deux corps discrets (Réf. 22)	ADN 1,38 (Réf. 23)
	Entomopoxvirus de Diptères Virus *Chironomus luridus*	320 x 230 x 110 parallélépipédique à contours émoussés (Réf. 24)	?	biconcave, contient un filament (Réf. 24)	deux corps développés (Réf. 24)	ADN (Réf. 24)

Tableau XV

REFERENCES :

(1) NAGINGTON, J., HORNE, R.W. (1962). Virology, 16, 248-260.

(2) WESTWOOD, J.C.N., HARRIS, W.J., ZWARTOUW, H.T., TITMUSS, D.H., APPLEYARD, G. (1964). J. gen. Microbiol., 34, 67-78.

(3) PETERS, D. (1956). Nature, 178, 1453.

(4) NOYES, W.F. (1962b). Virology, 18, 511-516.

(5) DALES, S. (1963). J. Cell. Biol., 18, 51-72.

(6) MULLER, G., PETERS, D. (1963). Arch. ges. Virusforsch., 13, 435-451.

(7) MEDZON, E.L., BAUER, H. (1970). Virology, 40, 860-867

(8) PETERS, D., MULLER, G. (1963). Virology, 21, 266-268.

(9) PETERS, D., BUTTNER, D. (1965b). Lab. Invest., 14, 496-506.

(10) PETERS, D., BUTTNER, D. (1964). 3rd europ. region. Conf. Electron. Microsc., Prague, vol. B, p. 377.

(11) ZWARTOUW, H.T. (1964). J. gen. Microbiol., 34, 115-128.

(12) JOKLIK, W.K. (1962a). Virology, 18, 9-18.

(13) NAGINGTON, J., NEWTON, A., HORNE, R.W. (1964). Virology, 23, 461-472.

(14) BUTTNER, D., GIESE, H., MULLER, G., PETERS, D. (1964). Arch. ges. Virusforsch., 14, 657-673.

(15) PETERS, D., MULLER, G., BUTTNER, D. (1964). Virology, 23, 609-611.

(16) VAGO, C. (1963). J. Insect. Pathol., 5, 275-276.

(17) VAGO, C., CROISSANT, O. (1964). Entomophaga, 9, 207-210.

(18) BERGOIN, M., SCALLA, R., DUTHOIT, J.L., VAGO, C. (1967). Proc. Colloq. Insect Pathol. micr. Control, Wageningen, p. 22-25.

(19) BERGOIN, M., DEVAUCHELLE, G., DUTHOIT, J.L., VAGO, C. (1968). C.R. Acad. Sc. Paris, 266, 2126-2128.

(20) BERGOIN, M., DEVAUCHELLE, G., VAGO, C. (1971). Virology, 43, 453-467.

(21) BERGOIN, M., VEYRUNES, J.C., VAGO, C. (1969). C.R. Acad. Sc. Paris, 269, 1464-1466.

(22) GRANADOS, R.R., ROBERTS, D.W. (1970). Virology, 40, 230-243.

(23) ROBERTS, D.W., BERGOIN, M. (1971). Proc. 4th internat. Colloq. Insect Pathol., College Park, U.S.A., p. 381-385.

(24) HUGER, A.M., KRIEG, A., EMSCHERMANN, P., GOTZ, P. (1970). J. Invertebr. Pathol., 15, 253-261.

acide nucléique est un ADN. D'autre part, les essais d'extraction et de caractérisation du génome de l'entomopoxvirus d'*Amsacta* laissent à penser que la chaîne d'ADN est probablement de haut poids moléculaire. Bien que fragmentaires, ces résultats apportent un élément essentiel de ressemblance entre ces virus et les poxvirus de vertébrés. De même, la mise en évidence dans le nucléoïde de l'entomopoxvirus d'*Amsacta* de 4 activités enzymatiques identiques à celles connues chez les poxvirus de vertébrés démontre de façon certaine les affinités qui existent entre ces virus.

Par suite du fort asynchronisme de l'infection dans les tissus étudiés, nous n'avons pu établir de façon précise la chronologie des étapes du cycle de réplication de l'entomopoxvirus de *Melolontha*. Cependant, la ressemblance des formes de développement de ce virus et des structures qui leur sont associées avec celles décrites chez les poxvirus de vertébrés est évidente (voir tableau XVI, page 168). Sur la base de ces ressemblances, nous avons pu reconstituer les principales étapes de ce cycle et en proposer un schéma qui, dans ses grandes lignes, se superpose à celui connu chez les poxvirus de vertébrés (voir Pl. LVIII, Fig. 182 ; Pl. LIX, Fig. 183). Nous avons, d'autre part, indiqué au chapitre IV que des stades de morphogénèse virale semblables à ceux que nous avons décrits chez l'entomopoxvirus de *Melolontha* sont connus chez d'autres virus de ce groupe. Il semble donc que le cycle de réplication s'effectue selon un même modèle chez tous les entomopoxvirus.

A la fin de ce cycle, les virions néoformés sont pour la plupart incorporés dans des inclusions protéiniques cristallines, équivalentes des inclusions de type A connues chez certaines souches de poxvirus de vertébrés. Ces inclusions, connues chez tous les entomopoxvirus, possèdent des propriétés physico-chimiques remarquables. En particulier, leur grande cohésion assure une protection efficace des virions qu'elles contiennent, favorisant ainsi la dispersion naturelle de ces agents. Par analogie avec les poxvirus de vertébrés, il est logique de penser que la synthèse de ces inclusions est sous le contrôle de l'information génétique virale.

Certaines souches d'entomopoxvirus possèdent, en outre, la propriété d'induire chez leur hôte la synthèse d'un deuxième type d'inclusions, de forme allongée, appelées fuseaux. Ces inclusions, également protéi-

niques et possédant une structure cristalline, diffèrent fondamentalement des précédentes par l'absence de virions et de caractère infectieux. Leur signification demeure obscure mais certaines preuves indirectes discutées au chapitre II (section II 4) suggèrent que leur synthèse pourrait également être contrôlée par le génome viral.

Bien que découverts récemment, les entomopoxvirus ont fait l'objet de nombreuses propositions de nomenclature et de classification.

Certains auteurs les ont nommés d'après leurs caractéristiques histopathologiques. Ainsi, l'entomopoxvirus de *Melolontha* était appelé à l'origine "virus de la maladie à fuseaux" de *Melolontha* (VAGO et CROISSANT, 1964). MEYNADIER et Coll., (1968), GOODWIN (1969) ont proposé les appellations virus d'"ovoïdose" ou de "sphéroïdose" par analogie avec les noms donnés aux autres virus d'insectes à corps d'inclusion, tels les virus de polyédroses et de granuloses.

En 1965, WEISER a proposé le nom de genre *Vagoïavirus* en vue de l'introduction des entomopoxvirus dans le système de classification des virus d'insectes alors en vigueur (BERGOLD et al., 1960). GRANADOS et ROBERTS (1970) ont proposé de regrouper les poxvirus d'insectes dans le sous-groupe des Insectpox, par analogie avec les noms donnés en langue anglaise aux sous-groupes des poxvirus de vertébrés (sheeppox, birdpox ...). GOTZ et Coll. (1969) ont proposé de grouper dans le même genre *Polypoxvirus* les poxvirus d'insectes et ceux de vertébrés chez lesquels on trouve des inclusions de type A. Enfin, dans un article intitulé "A suggested latinized nomenclature of occluded insect viruses", HARRAP et TINSLEY (1971) ont proposé de rassembler les virus d'insectes de type pox dans une nouvelle Famille, celle des *Arthropoxviridae*.

Aucune de ces propositions ne répond aux règles de nomenclature établies par le Comité International de Nomenclature des Virus (ICNV), lors du IXe Congrès International de Microbiologie tenu à Moscou, en Juillet 1966. Le nom d'entomopoxvirus que nous avons proposé pour nommer les virus d'insectes présentant les principales caractéristiques des poxvirus de vertébrés, telles qu'elles ont été énumérées précédemment, nous paraît respecter

Tableau XVI

CARACTERISTIQUES DE LA MORPHOGENESE DES POXVIRUS DE VERTEBRES ET D'INVERTEBRES

	Particules immatures			Dissémination des virions néoformés
	Forme et dimension (nm)	Structure de l'enveloppe	Structure interne	
POXVIRUS DE VERTEBRES vaccine	sphérique 360 (Réf. 1, 2)	membrane unitaire de 50-55 Å d'épaisseur recouverte par des spicules de 100 Å de long (Réf. 1, 2, 4)	"nucléoïde" dense à structure fibrillaire et en position excentrique (Réf. 1, 3)	enveloppement des virions dans des citernes de r.e. lisse, expulsion des virions par fusion des citernes avec la membrane cellulaire ; pas d'inclusions de type A (Réf. 2)
POXVIRUS D'INVERTEBRES Entomopoxvirus de *Melolontha*	sphérique 450-500 (Réf. 5)	membrane unitaire de 75 Å d'épaisseur recouverte d'une couche indifférenciée de même épaisseur (Réf. 5, 6)	"nucléoïde" dense en position excentrique (Réf. 6)	enveloppement des virions dans des membranes cytoplasmiques (tissu adipeux) ; rejet des virions par exocytose (hémocytes) ; inclusion des virions dans les "sphérules" (inclusions de type A) (tissu adipeux, rarement hémocytes) (Réf. 6, 7, 8)
Entomopoxvirus d'*Amsacta*	sphérique 350 (Réf. 9)	2 membranes unitaires de 60 et 75 Å d'épaisseur séparées par un espace de 75 Å (Réf. 9)	"nucléoïde" dense en position excentrique (Réf. 9)	inclusion des virions dans les "sphérules" (inclusions de type A) (Réf. 9)
Entomopoxvirus de *Chironomus Luridus*	sphérique 275	membrane unitaire recouverte d'une couche "ondulée" 150 Å d'épaisseur totale	"nucléoïde" dense à structure fibrillaire et en position excentrique	inclusion des virions dans les "sphérules" (inclusions de type A)

Tableau XVI

REFERENCES :

(1) DALES, S., SIMINOVITCH, L. (1961). J. biophys. biochem. Cytol., 10, 475-502.

(2) DALES, S. (1963). J. Cell Biol., 18, 51-72.

(3) KAJIOKA, N., SIMINOVITCH, L., DALES, S. (1964). Virology, 24, 295-309.

(4) DALES, S., MOSBACH, E.H. (1968). Virology, 35, 564-583.

(5) BERGOIN, M., DEVAUCHELLE, G., VAGO, C. (1968). C.R. Acad. Sc. Paris, 267, 382-385.

(6) BERGOIN, M., DEVAUCHELLE, G., VAGO, C. (1969). Arch. ges. Virusforsch., 28, 286-302.

(7) DEVAUCHELLE, G., BERGOIN, M., VAGO, C. (1970). C.R. Acad. Sc. Paris, 271, 1138-1240.

(8) DEVAUCHELLE, G., BERGOIN, M., VAGO, C. (1971). J. Ultrastr. Res., 37, 301-321.

(9) GRANADOS, R.R., ROBERTS, D.W. (1970). Virology, 40, 230-243.

(10) HUGER, A.M., KRIEG, A., EMSCHERMANN, P., GÖTZ, P. (1970). J. Invertebr. Pathol., 15, 253-261.

ces règles. Cette proposition a été acceptée par le Sous-Comité de Nomenclature des Virus d'Invertébrés de l'ICNV (WILDY, 1971). Dans le système de nomenclature latine binomale recommandé par l'ICNV, ce nom a valeur de nom de genre. Nous avons proposé de désigner le nom d'espèce par le nom de genre de l'insecte hôte d'origine, l'espèce type étant celle décrite chez *Melolontha melolontha*. Ainsi, tous les virus de type pox décrits chez les insectes peuvent être nommés : *Entomopoxvirus melolonthae*, *Entomopoxvirus amsactae*, *Entomopoxvirus camptochironomi*, etc.

La famille des *Poxviridae*, telle qu'elle est définie dans le système LHT de classification (LWOFF et TOURNIER, 1971) se trouve de ce fait élargie par l'apport du genre *Entomopoxvirus*. Ces propositions nous paraissent raisonnables dans l'état actuel de nos connaissances, étant bien entendu qu'elles pourront être modifiées lorsqu'on disposera de caractères discrimatifs supplémentaires.

- RESUME ET CONCLUSIONS -

Nous avons étudié deux virus entomopathogènes : l'entomopoxvirus du coléoptère *Melolontha melolontha* et l'entomopoxvirus du lépidoptère *Amsacta moorei*.

Les principaux résultats obtenus et les conclusions que l'on peut tirer de l'étude de chacun de ces virus sont présentés ci-dessous.

L'ENTOMOPOXVIRUS DE *MELOLONTHA*

- Les inclusions

— L'étude morphologique et ultrastructurale des inclusions cytoplasmiques, fuseaux et sphérules, présentes dans les cellules infectées de *Melolontha* indique des différences importantes entre ces deux types d'inclusions.

Les sphérules renferment des virions inclus dans une trame cristalline et rappellent de ce fait certains corps d'inclusion de virus d'autres viroses d'insectes.

Les fuseaux diffèrent essentiellement des sphérules par l'absence de virions inclus dans leur trame cristalline et la présence constante d'une membrane de réticulum endoplasmique granulaire les entourant.

— Fuseaux et sphérules montrent une résistance inusitée aux divers agents chimiques, en particulier aux solutions alcalines. Leur dissolution ne peut être réalisée à des pH avoisinant 10 qu'en présence d'agents réducteurs.

— L'analyse chimique des fuseaux et des sphérules purifiés a révélé la nature essentiellement protéinique de ces deux types d'inclusions. L'analyse quantitative de leurs acides aminés montre qu'ils renferment les mêmes résidus mais dans des proportions différentes. Les deux types d'inclusions ont une teneur élevée en résidus d'acides aminés aromatiques, particulièrement en tyrosine, responsable de la forte absorption dans l'ultra-violet des protéines dissoutes de ces inclusions. Fuseaux et sphérules ont également une teneur élevée en résidus cystine, ce qui explique le rôle des agents réducteurs dans la solubilisation de leurs protéines.

Les fuseaux et les sphérules contiennent respectivement 3,1 et 0,7 µg d'ARN par mg de poids sec. Les sphérules contiennent en outre 1,5 µg d'ADN. L'hypothèse selon laquelle l'ARN contenu dans ces inclusions correspond à des molécules d'ARN messagers impliquées dans la synthèse de leurs protéines et incorporées aux cristaux au cours de leur croissance paraît la plus vraisemblable. La fraction ADN des sphérules correspond à l'acide nucléique contenu dans les virions.

— Les suspensions de sphérules sont infectieuses à la fois par inoculation et *per os* alors que celles de fuseaux ne le sont pas, quel que soit le mode d'administration. Les protéines solubilisées des deux types d'inclusions n'ont aucun pouvoir toxique.

— L'ensemble des données sur la structure, le mode de développement, les propriétés physico-chimiques et la composition chimique des inclusions associées à l'entomopoxvirus de *Melolontha* permet de reconnaître les fuseaux comme des entités distinctes des sphérules.

— S'il est logique de considérer les sphérules comme l'équivalent des inclusions de type A des poxvirus de vertébrés (voir plus loin), la signification des fuseaux qui ne semblent jouer aucun rôle dans la maladie virale demeure obscure.

• Structure du virion

L'étude en coloration négative et en coupes ultra-fines des particules mûres a permis d'élucider la complexité de leur architecture.

Les virions sont de forme ovoïde et mesurent en moyenne 2.500 Å de large et 4.000 Å de long. Trois constituants majeurs participent à leur architecture :

- une enveloppe dont la surface bosselée donne aux particules l'aspect d'une mûre ;
- un nucléoïde unilatéralement concave délimité par une coque et renfermant une structure filamenteuse repliée sur elle-même ;
- un corps latéral logé dans la concavité du nucléoïde.

— L'étude cytochimique à haute résolution a d'autre part révélé :

- la nature ADN du génome viral et sa localisation à l'intérieur du nucléoïde ;
- la nature protéinique des constituants du corps latéral et de la substance périnucléoïdale ;
- la présence à la surface des virions inclus dans les sphérules ainsi qu'à l'intérieur de leur nucléoïde de matériel prenant la coloration des glycoprotéines.

• Purification des virions et caractérisation des suspensions virales

La purification des virions réalisée par dissolution des sphérules a permis leur analyse spectrophotométrique et biochimique.

L'analyse spectrophotométrique des virions de l'entomopoxvirus de *Melolontha* a mis en évidence la ressemblance de leur spectre d'absorption dans l'ultra-violet avec celui des poxvirus de vertébrés. Il s'agit, dans l'un et l'autre cas, de virions de grande taille qui se comportent comme des particules en suspension et non comme des solutions de nucléoprotéines. Il s'en suit une importante diffraction de la lumière qui représente l'essentiel de l'absorption mesurée (87 % à 260 nm pour l'entomopoxvirus contre 90 % pour les poxvirus de vertébrés).

L'identification biochimique du génome viral à un ADN confirme les résultats de la cytochimie et apporte une preuve supplémentaire de la parenté de ce virus avec les poxvirus de vertébrés. Les résultats des dosages d'ADN et de protéines dans les virions font apparaître des différences quantitatives par rapport aux poxvirus de vertébrés. Ainsi, la teneur en protéine de l'entomopoxvirus est légèrement plus forte que celle des poxvirus de vertébrés (72,4 µg/UDO_{260} contre 64 µg/UDO_{260} pour le cowpox) et le pourcentage d'ADN est nettement plus faible (2,2 % contre 5 % en moyenne pour les poxvirus de vertébrés).

- Etude ultrastructurale du cycle de multiplication virale dans les cellules adipeuses

Le cycle de multiplication de l'entomopoxvirus de *Melolontha* tel que nous l'avons observé dans les cellules adipeuses de son hôte apparaît fort complexe et présente de nombreuses analogies avec celui des poxvirus de vertébrés. Les étapes du cycle de multiplication de ces virions ont été analysées avec une grande précision dans leur chronologie en utilisant des cultures cellulaires infectées de façon synchrone. En l'absence de système *in vitro* comparable et à cause du fort asynchronisme du développement viral dans le système cellulaire que nous avons étudié, une analyse aussi précise n'a pu être réalisée avec l'entomopoxvirus de *Melolontha*.

Toutefois, l'observation de formes immatures présentant divers degrés d'organisation nous a permis de reconstituer la séquence des principales étapes de la morphogénèse virale.

Dans des aires cytoplasmiques proches du noyau apparaissent au contact direct de masses denses aux électrons appelées viroplasmes, des enveloppes virales en forme de cupule (type I). En se refermant sur elles-mêmes, ces enveloppes encerclent une portion du viroplasme et donnent naissance à des particules sphériques denses aux électrons (type 3). Ces formes semblent pouvoir se développer également sans contact direct avec les viroplasmes et passeraient alors par un stade intermédiaire de particules sphériques claires (type 2). Autour d'un noyau de condensation apparaissant au sein de la substance dense des particules de type 3 se différencient les

constituants du nucléoïde (type 4). Enfin, la particule s'allonge et, par condensation de matériel entre l'enveloppe et le nucléoïde, se transforme en particule mûre (types 5 et 6).

Deux modes de dissémination des virions produits dans les cellules adipeuses ont été reconnus. Le premier, qui est le rejet des virions dans les espaces intercellulaires, intervient selon toute vraisemblance dans la propagation de l'infection à l'échelle tissulaire. Le deuxième, qui consiste en l'intégration des virions dans un réseau cristallin protéinique aboutissant à la formation des sphérules a, par contre, une signification épidémiologique. Par le grand nombre de virions qu'elles renferment et leurs propriétés physico-chimiques remarquables, ces inclusions assurent une dissémination efficace du virus dans la nature.

• Les altérations du tissu adipeux au cours de l'infection virale

L'étude comparée au microscope électronique des cellules adipeuses saines et infectées de *Melolontha* a permis de mettre en évidence un certain nombre de modifications cellulaires au cours de la maladie virale que l'on peut classer arbitrairement en trois catégories :

- diminution progressive des substances de réserves,
- altérations des structures cellulaires normales,
- apparition de nouvelles structures directement liées aux synthèses virales.

Le métabolisme des cellules adipeuses de *Melolontha* semble essentiellement orienté au dernier stade larvaire vers la synthèse et l'accumulation de produits de réserves : glycogène, lipides et protéines qui serviront au moment de la métamorphose. Ces réserves se présentent au microscope électronique sous forme d'enclaves occupant la quasi totalité du cytoplasme. Un des effets les plus évidents de la multiplication virale dans ces cellules est la perturbation de ces synthèses au profit de celles des constituants viraux et des protéines de fuseaux et de sphérules. Ces désordres métaboliques se traduisent, entre autre, par la perte progressive des substances de réserves.

Des altérations des cellules adipeuses de *Melolontha*, nous retiendrons l'hypertrophie nucléaire avec perte d'opacité aux électrons du nucléoplasme et la présence de tubules dans les espaces intercellulaires. La première se produit à un stade précoce de l'infection et s'accentue tout au long de la maladie. Elle suggère des interactions entre génome cellulaire et multiplication virale dont on ne peut définir la nature actuellement. En ce qui concerne les formations tubulaires à structure hélicoïde observées entre des cellules adjacentes infectées, elles correspondent vraisemblablement à des néoformations et non à la dissociation de structures préexistantes. Leur affinité pour le rouge de ruthénium et l'acide phosphotungstique à pH acide suggère qu'elles pourraient se former à partir de la couche mucopolysaccharidique recouvrant les cellules (glycocalyx).

L'ENTOMOPOXVIRUS D'*AMSACTA*

• Les inclusions

L'étude des inclusions de l'entomopoxvirus d'*Amsacta* montre qu'elles ne diffèrent pas fondamentalement des sphérules de l'entomopoxvirus de *Melolontha*. Elles s'en distinguent cependant par un certain nombre de caractères.

— Tout d'abord, sur le plan de la morphologie, leur petite taille, leur forme allongée et l'absence de rangement apparent des virions au sein de la trame cristalline contrastent avec la grande taille et l'organisation des sphérules. L'absence de fuseaux associés aux inclusions de virus est également une propriété remarquable de cette virose.

— A l'image des sphérules, les inclusions du poxvirus d'*Amsacta* ne sont solubles en milieu faiblement alcalin qu'en présence d'un agent réducteur, ce qui implique la présence dans leurs molécules de ponts disulfure. Leur dissolution rapide dans le liquide régurgité par les larves d'*Estigmene* contraste avec la lenteur de dissolution des sphérules dans le suc digestif des larves de *Melolontha*.

— La composition chimique globale des inclusions est proche de celle des sphérules de *Melolontha*, bien que leur teneur en ARN et ADN soit supérieure (2,44 et 3,95 µg/mg, respectivement). Ces différences dans la teneur en acides nucléiques rappellent celles observées chez les inclusions de baculovirus.

• Etude de quelques propriétés des suspensions virales purifiées

— Tant par leurs propriétés spectrales que leur composition chimique, les virions du poxvirus d'*Amsacta* diffèrent peu de ceux du poxvirus de *Melolontha* et de la vaccine. Leur teneur en ADN est toutefois plus faible (1,38 %) et ne représente qu'environ le 1/3 de celle du virus vaccinal.

— Des essais d'extraction de l'ADN viral par différentes techniques ne nous ont pas permis d'isoler des molécules intactes. L'estimation de son poids moléculaire à 65×10^6 daltons d'après une seule mesure approchée de son coefficient de sédimentation ne peut être considérée comme une valeur sûre.

— Nous avons mis en évidence dans le virion la présence de 4 enzymes décrites chez les poxvirus de vertébrés : une ARN polymérase ADN dépendante, une nucléotide phosphohydrolase et deux désoxyribonucléases, l'une à pH optimum d'action 5,0 est une exonucléase, l'autre est une endonucléase dont le pH optimum d'action est 7,8.

La présence de ces enzymes possédant les mêmes caractéristiques que celles mises en évidence chez les poxvirus de vertébrés apporte une preuve supplémentaire aux données morphologiques, morphogénétiques et chimiques de la ressemblance de ce virus avec ceux du groupe des poxvirus. Nous pensons que ce critère enzymatique pourrait servir de complément aux critères morphologiques déjà établis, pour identifier les autres entomopoxvirus comme des poxvirus.

COMPARAISONS ENTRE LES ENTOMOPOXVIRUS

Nous avons confronté nos résultats de l'étude de l'entomopoxvirus de *Melolontha* et de celui d'*Amsacta* à ceux des auteurs qui ont étudié d'autres entomopoxvirus. Les conclusions suivantes se dégagent de ces comparaisons :

— Selon le groupe d'insectes considéré, et au sein d'un même groupe suivant l'espèce, les maladies à entomopoxvirus présentent une grande diversité, tant par la nature des tissus atteints que par la forme et les types d'inclusions produites. En ce qui concerne le premier point, il est à noter que le tissu adipeux, particulièrement riche en produits de réserves chez les larves d'insectes, est le site principal de multiplication du virus.

La taille des inclusions de type sphérules et, par voie de conséquence, leur nombre dans une même cellule et le nombre de virions qu'elles renferment, varient dans de larges proportions d'une souche à l'autre.

Parallèlement aux inclusions de type sphérules, d'autres ne renfermant pas de virions (inclusions de type fuseaux) sont également produites chez certains insectes. La diversité de forme et de taille de ces inclusions est également très grande d'un cas à l'autre. Le fait qu'elles ne soient pas toujours présentes indique qu'elles ne jouent pas un rôle essentiel dans la multiplication virale.

— Bien qu'il soit encore prématuré de tirer des conclusions définitives des données sur la morphologie des virions, il semble que l'on puisse grouper les entomopoxvirus en trois types distincts :

- le type entomopoxvirus de *Melolontha* auquel se rattachent les autres poxvirus de coléoptères. Les virions de ce type sont les plus gros connus, leur forme est franchement ovale et leur nucléoïde unilatéralement concave. Ils ne possèdent qu'un corps latéral ;

- le type entomopoxvirus d'*Amsacta* auquel se rattachent les autres poxvirus de lépidoptères et celui de l'orthoptère *Melanoplus sanguinipes*. Les

virions sont plus petits, de forme ovale et leur nucléoïde est cylindrique ou légèrement biconcave. Ils possèdent deux corps latéraux discrets ;

- le type entomopoxvirus de diptères représenté par les virus de chironomes. Les virions sont nettement plus petits et leurs contours plus anguleux que chez les autres entomopoxvirus. Ils possèdent un nucléoïde franchement biconcave et deux corps latéraux bien développés. Par leur taille et leur architecture, ces virus sont de tous les entomopoxvirus ceux qui ressemblent le plus aux poxvirus de vertébrés.

Ce groupement des entomopoxvirus en trois types repose, nous l'avons dit, uniquement sur des critères morphologiques et sa valeur est, de ce fait, toute relative. L'isolement de nouvelles souches et l'approfondissement de nos connaissances sur les souches actuellement décrites nous amèneront à confirmer ou à modifier nos conceptions actuelles. La comparaison sérologique des différentes souches apparaît en particulier indispensable à tout essai de classification des virus au sein de ce groupe.

Enfin, nous retiendrons que la morphogénèse virale, là où elle a pu être observée, s'effectue chez tous les entomopoxvirus selon un processus semblable.

COMPARAISONS ENTRE POXVIRUS DE VERTEBRES ET D'INVERTEBRES

Les virus d'insectes que nous avons étudiés possèdent de nombreux caractères communs avec ceux du groupe des poxvirus de vertébrés.

— D'un point de vue morphologique et structural, l'architecture des formes mûres de ces virus d'insectes est très voisine de celle des poxvirus. Comme ces derniers, ils sont de grande taille, de forme ovale ou grossièrement parallélépipédique, et possèdent une enveloppe portant une ornementation caractéristique. L'intérieur du virion est occupé par un corps central, appelé nucléoïde, délimité par une double coque. De part et d'autre de cette coque, sont disposées une ou deux formations lenticulaires appelées corps latéraux (voir tableau XV).

Ce type d'architecture complexe ne se retrouve chez les virions d'aucun autre groupe de virus et confère de ce fait aux poxvirus une grande originalité dans le monde viral. Cette remarquable unité de structure entre agents de vertébrés et d'invertébrés impose à elle seule l'élargissement du groupe des poxvirus.

— La ressemblance des formes de développement de l'entomopoxvirus de *Melolontha* telles que nous les avons observées sur coupes ultrafines de tissu adipeux avec celles décrites chez les poxvirus de vertébrés est évidente (voir Pl. XXVII et LVI). Nous avons, d'autre part, reconnu dans les cellules sanguines des stades précoces du cycle de multiplication de ce virus, précédant la morphogénèse virale, tels la pénétration des virions par phagocytose, leur dégradation progressive aboutissant à la libération du génome viral et l'apparition de foyers de réplication de l'ADN. Ces stades, comme ceux de la morphogénèse, ont été analysés avec précision chez les poxvirus. Sur la base des ressemblances morphologiques mentionnées ci-dessus, nous avons pu reconstituer les principales étapes de ce cycle et en proposer un schéma qui se superpose, dans ses grandes lignes, à celui des poxvirus de vertébrés (voir Pl. LVIII et LIX et tableau XVI). Mentionnons cependant que seules certaines souches de poxvirus de vertébrés ont la propriété de produire des inclusions de type A dans lesquelles les virions néoformés sont incorporés à la fin du cycle de multiplication, alors que cette propriété est commune à tous les entomopoxvirus. Chez ces derniers ces inclusions possèdent, d'autre part, des propriétés physico-chimiques remarquables.

— L'analyse chimique partielle des virions des entomopoxvirus de *Melolontha* et d'*Amsacta* a montré que leur acide nucléique est un ADN. D'autre part, les essais d'extraction et de caractérisation du génome de l'entomopoxvirus d'*Amsacta* laissent à penser que la chaîne d'ADN est probablement de haut poids moléculaire. Ces résultats, bien que fragmentaires, apportent un élément essentiel de ressemblance entre ces virus et les poxvirus de vertébrés dont on sait que le génome consiste en une molécule linéaire d'ADN bicaténaire de poids moléculaire compris entre 160 et 200 x 10^6 daltons.

— Enfin, la mise en évidence, dans le nucléoïde de l'entomopoxvirus d'*Amsacta*, de 4 activités enzymatiques identiques à celles caracté-

risées chez les poxvirus de vertébrés démontre de façon certaine les affinités qui existent entre ces virus.

L'ensemble de caractères communs aux poxvirus de vertébrés et aux virus d'insectes que nous avons étudiés permet d'affirmer que l'on a affaire à un seul et même groupe homogène tant au point de vue de la structure et de la morphogénèse que de la composition chimique. L'homogénéité de ce groupe est telle qu'il y a tout lieu de penser que son origine est monophylétique. Les insectes ayant précédé de plusieurs millions d'années l'apparition sur la terre des vertébrés supérieurs, on peut se demander si les agents de ces organismes ne dériveraient pas de certaines souches de poxvirus d'insectes.

L'examen détaillé des constituants du virion fait cependant apparaître des différences mineures qui permettent de distinguer plusieurs sous-groupes au sein de cet ensemble. Ainsi, sur la base de critères morphologiques, on a coutume de ranger les poxvirus de vertébrés en deux sous-groupes, celui des vaccines et celui des paravaccines.

Les virions des agents d'insectes sont, en règle générale, de forme ovoïde et de taille plus grande que ceux des poxvirus de vertébrés. Les éléments globuleux formant la surface de leur enveloppe diffèrent assez sensiblement des rides ou de la structure filamenteuse décrites à la surface de ces derniers. Nous avons vu, d'autre part, que l'organisation plus diversifiée de leur structure interne permet de reconnaître au sein des agents d'insectes trois types principaux (voir tableau XV). Ces caractéristiques, liées à leur spécificité nous ont paru suffisantes pour grouper provisoirement ces virus d'insectes dans un même ensemble pour lequel nous avons proposé le nom d'entomopoxvirus (BERGOIN, VEYRUNES, VAGO, 1969). Cette proposition a été acceptée par le Sous-Comité de Nomenclature des Virus d'Invertébrés de l'ICNV (WILDY, 1971). Ce nouveau sous-groupe s'ajoutant à ceux déjà existants chez les poxvirus de vertébrés grandit ainsi la Famille des *Poxviridae* telle que l'ont définie LWOFF, HORNE et TOURNIER dans leur système de classification des virus (LWOFF et TOURNIER, 1971).

- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES -

ADAMS, J.R., WILCOX, T.A. (1968). *Histopathology of the almond moth, Cadra cautella, infected with a nuclear polyhedrosis virus.* J. Invertebr. Pathol., 12, 269-274.

ADKISSON, P.L., VANDERZANT, E.S., BULL, D.L., ALLISON, W.E. (1960). *A wheat germ medium for rearing the Pink Bollworm.* J. econ. Entomol., 53 759-762.

AIZAWA, K., IIDA, S. (1963). *Nucleic acids extracted from the virus polyhedra of the silkworm Bombyx mori (Linnaeus).* J. Insect. Pathol. 5, 344-348.

ALLISON, A.C., BURKE, D.C.(1962). *The nucleic acid contents of viruses.* J. gen. Microbiol. 27, 181-194.

AMARGIER, A., VAGO, C., MEYNADIER, G. (1964). *Etude histopathologique de l'évolution de la virose à fuseaux chez le Coléoptère Melolontha melolontha.* Mikroskopie. 19, 309-315.

APPLEYARD, G. (1961). *An immunizing antigen from rabbit-pox and vaccinia viruses,* Nature, 190, 465-466.

APPLEYARD, G., HAPEL, A.J., BOULTER, E.A. (1971). *An antigenic différence between intracellular and extracellular rabbitpox virus.* J. gen. Virol., 13, 9-17.

APPLEYARD, G., HUME, V.B.M., WESTWOOD, J.C.N. (1965). *The effect of thiosemicarbazones on the growth of rabbitpox virus in tissue culture.* Ann. N.Y. Acad. Sci., 130, 92-104.

APPLEYARD, G., WESTWOOD, J.C.N. (1964a). *The growth of rabbitpox virus in tissue culture.* J. gen. Microbiol., 37, 391-401.

APPLEYARD, G., WESTWOOD, J.C.N. (1964b). *A protective antigen from the poxviruses. II. Immunization of animals.* Brit. J. exper. Pathol. 45, 162-173.

APPLEYARD, G., ZWARTOUW, H.T. (1967). *Preparation of antigens from animal viruses.In"Handbook of Experimental Immunology".* Edit. D.M. WEIR. BLACKWELL Sc. Publications, Oxford and Edimburgh, pp. 376-399.

APPLEYARD, G., ZWARTOUW, H.T., WESTWOOD, J.C.N. (1964). *A protective antigen from the poxviruses. I. Reaction with neutralizing antibody.* Brit. J. exper. Pathol., 45, 150-161.

ARHELGER, R.B., DARLINGTON, R.W., GAFFORD, L.G., RANDALL, C.C. (1962). *An electron microscopic study of fowlpox infection in chick scalps.* Lab. Invest. 11, 814-825.

ARHELGER, R.B., RANDALL, C.C. (1964). *Electron microscopic observations on the development of fowlpox virus in chorioallantoic membrane.* Virology, 22, 59-66.

AVAKYAN, A.A., BYCKOVSKY, A.F. (1965). *Ontogenesis of human smallpox virus.* J. Cell Biol., 24, 337-347.

BANFIELD, W.G., BRINDLEY, D.C. (1959). *An electron microscopic study of the epidermal lesion of Molluscum contagiosum.* Ann. N.Y. Acad. Sci., 81; 145-163.

BANFIELD, W.G., BUNTING, H., STAUSS, M.J., MELNICK, J.L. (1952). *The morphology and development of Molluscum contagiosum from electron micrographs of thin sections.* Exper. Cell. Res., 3, 373-382.

BECKER, Y., JOKLIK, W.K. (1964). *Messenger RNA in cells infected with vaccin virus.* Proc. nation. Acad. Sci. U.S.A., 51, 577-585.

BECKER, Y., SAROV, I. (1968). *Electron microscopy of vaccinia virus DNA.* J. mol. Biol., 34, 655-660.

BERGOLD, G.H. (1963). *The nature of nuclear polyhedrosis viruses. In : "Insect Pathology, an advanced treatise"* (E.A. Steinhaus, ed.). Academic Press, New York, London, vol. 1, pp. 413-456.

BERGOLD, G.H., AIZAWA, K., SMITH, K.M., STEINHAUS, E.A., VAGO, C. (1960). *The present status of insect virus nomenclature and classification.* Intern. Bull. of bacteriol. Nomenclature and Taxonymy, 10, 259-262.

BERGOLD, G.H., WELLINGTON, E.F. (1954). *Isolation and chemical composition of the membranes of an insect virus and their relation to the virus and polyhedral bodies.* J. Bacteriol., 67, 210-216.

BERNHARD, W. (1969). *A new staining procedure for electron microscopical cytology.* J. Ultrastruct. Res. 27, 250-255.

BERNHARD, W., HAREL J., OBERLING, G. (1954). *Le virus fibromateux de Shope dans les tumeurs malignes provoquées par lui : Etude au microscope électronique.* C.R. Acad. Sci., 239, 732-734.

BIERWOLF, D., RANDT, A., SCHOLZ, G. (1968). *Vermehrung und Feinstruktur der Molluscum contagiosum Virus.* Arch. Geschew. Forsch. Dtsch. 31, 97-114.

BIRD F.T., SANDERS, C.J., BURKE, J.M. (1971). *A newly discovered Virus Disease of the Spruca Budworm Choristoneura biennis (Lepidoptera : Tortricidae).* J. Invertebr. Pathol., 18, 159-161.

BONAMI, J.R. (1970). *Recherches cytopathologiques sur les viroses de type Pox des insectes.* Thèse de Spéc., Montpellier, 83 pp.

BONHOEFFER, F., SCHACHMAN, H.K. (1960). *Studies on the organization of nucleic acid within nucleoproteins.* Biochem. biophys. Res. Commun., 2, 366-371.

BRENNER, S., HORNE, R.W. (1959). *A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses.* Biochem. Biophys. Acta, 34, 103-110.

BUTTNER, D., GIESE, H., MULLER, G., PETERS, D. (1964). *Die Feinstruktur reifer Elementarkörper des Ecthyma contagiosum und der Stomatitis papulosa.* Arch. ges. Viruforsch. 14, 657-673.

CAIRNS, H.F.J. (1960). *The initiation of vaccinia infection.* Virology. 11, 603-623.

CASEY, H., WOODRUFF, J., BUTCHER, W. (1967). *Electron microscopy of a benign epidermal Pox disease of Rhesus monkeys.* Amer. J. Pathol., 51 431-446.

CASPAR, D.L.D., DULBECCO, R., KLUG, A., LWOFF, A., STOKER, M.G.P., TOURNIER, P, WILDY, P. (1962). *Proposals.* Cold Spring Harbor Symp. quant. Biol., 27, p. 49.

CHANG, L.M.S., HODES, M.E. (1967). *Induction of DNA nucleotidyltransferase by the Shope fibroma virus.* Virology, 32, 258-266.

CHAPPLE, P.J., WESTWOOD, J.C.N. (1963). *Electron microscopy of myxoma virus.* Nature, 199, 199-200.

CHARLES, A. (1960). *An electron microscope study of Molluscum contagiosum.* J. Hyg. 58, 45-56.

CHARRET, R. (1969). *L'ADN nucléolaire chez Tetrahymena pyriformis : Chronologie de sa réplication.* Exp. Cell. Res., 54, 353-361.

CHEVILLE, N.F. (1966). *Cytopathologic changes in Fowlpox (turkey origin) inclusion body formation.* The Am. J. Pathol., 49, 723-737.

COHEN, J., BERERHI, A., RIBERO, M., VINCENT, J., DELAGNEAU, J.F. (1971). *Etude au microscope électronique de la morphogénèse du virus de la clavelie (variole ovine) en culture de tissus.* Ann. Inst. Pasteur. 121, 569-577.

COHEN, J., WILCOX, W.C., (1966). *Soluble antigens of vaccinia infected mammalian cells. I. Separation of virus induced soluble antigens into two classes on the basis of physical characteristic.* J. Bacteriol., 92, 676-686.

CROIZIER, G., VEYRUNES, J.C. (1971). *Analyse immunochimique des inclusions de la "maladie à fuseaux" du Coleoptère Melolontha melolontha L.* Ann. Inst. Pasteur, 120, 709-715.

CUNNINGHAM, J.C. (1971). *An ultrastructural study of the development of a nuclear polyhedrosis virus of the Eastern hemlock looper., Lambdina fiscellaria fiscellaria.* Canad. J. Microbiol., 17, 69-72.

DALES, S. (1963). *The uptake and development of vaccinia virus in strain L cells followed with labeled viral deoxyribonucleic acid.* J. Cell Biol. 18, 51-72.

DALES, S. (1965a). *Penetration of animal viruses into cells.* Progr. med. Virol., 7, 143.

DALES, S. (1965b). *Replication of animal viruses as studied by electron microscopy.* Amer. J. Med. 38, 699-715.

DALES, S., KAJIOKA, R. (1964). *The cycle of multiplication of vaccinia virus in Earle's strain L cells. I. Uptake and penetration.* Virology, 24, 278-294.

DALES, S., MOSBACH, E.H. (1968). *Vaccinia as a model for membrane biogenesis.* Virology, 35, 564-583.

DALES, S., SIMONOVITCH, L. (1961). *The development of vaccinia virus in Earle's L strain cells as examined by electron microscopy.* J. biophys. biochem. Cytol., 10, 475-502.

DAWSON, I.M., McFARLANE, A.S. (1948). *Structure of an animal virus.* Nature. 161, 464.

de HARVEN, E., YOHN, D.S. (1964). *Electron microscopy of the Yaba tumor virus.* J. appl. Physiol., 35, 3082.

de HARVEN, E., YOHN, D.S. (1966). *The fine structure of Yaba monkey tumor Pox virus.* Cancer. Res., 26, 995-1008.

DESNUELLE, P., CHANG, C.T., FROMAGEOT, C. (1943). *Sur la protéine du virus de la maladie à polyèdres (grasserie) du ver à soie.* Ann. Inst. Pasteur., 69, 75-86.

DESNUELLE, P., CHANG, C.T. (1943). *Sur la protéine du virus de la grasserie du ver à soie. II. Répartition du soufre et teneur en alanine.* Ann. Inst. Pasteur, 69, 248-250.

DESNUELLE, P., CHANG, C.T. (1945). *Sur la protéine de la grasserie du ver à soie. III. Etude de certains de ses groupements libres.* Ann. Inst. Pasteur, 71, 264-272.

DEVAUCHELLE, G. (1972). *Contribution à l'étude de la structure fine de quelques agents pathogènes dans les hémocytes du Coléoptère Melolontha melolontha (L.)* . Thèse Doct. Sci. nat., Montpellier, 215 pp.

DISCHE, Z. (1930). *Uber einige neue charakteristische Farbreaktionen der Thymonukleïnsaüre und eine Mikromethode zur Bestimmung derselben in tierischen Organen mit Hilfe dieser Reaktionen.* Mikrochemie, 8, 4-32.

DOURMASHKIN, R., BERNHARD, W. (1959). *A study with the electron microscope of the skin tumor of Molluscum contagiosum..*J. Ultrastruct. Res., 3, 11-38.

DOURMASHKIN, R., DUPERRAT, B. (1958). *Observation au microscope électronique du virus du Molluscum contagiosum* C.R. Acad. Sci., 246, 3133-3136.

EASTERBROOK, K.B. (1962). *Interference with the maturation of vaccinia virus by isatin-beta thiosemicarbazone.* Virology, 17, 245-251.

EASTERBROOK, K.B. (1966). *Controlled degradation of vaccinia virions in vitro an electron microscopic study.* J. Ultrastruct. Res., 14, 484-496.

EDGAR, R.S., DENHARDT, G.H., EPSTEIN, R.H. (1964). *A comparative genetic study of conditional lethal mutation of bacteriophage T_4D.* Genetics, 49, 635-648.

ESTES, Z.E., IGNOFFO, C.M. (1965). *The nucleic-acid composition of nuclear polyhedral bodies affecting Heliothis zea (Boddie).* J. Invertebr. Pathol., 7, 258-259.

FAULKNER, P. (1962). *Isolation and analysis of ribonucleic acid from inclusion bodies of the nuclear polyhedrosis of the silkworm.* Virology, 16, 479-484.

FAUST, R.M. (1966). *Content of nucleic acid in intact nuclear polyhedral bodies isolated from virus-infected beet armyworms Spodoptera exigua (Lepidoptera : Noctuidae).* J. Invertebr. Pathol. 8, 273-474.

FAUST, R.M., ESTES, Z.E. (1965). *Nucleic acid composition of the nuclear polyhedrosis virus from Trichoplusia ni* J. Invertebr. Pathol. 7,521-522.

FEBVRE, H. (1962). *The Shope fibroma virus of rabbits. In :"tumors induced by viruses. Ultrastructural studies".* A.J. DALTON and F. HAGUENAU ed. Acad. Press. N.Y., vol. 1, 79.

FEBVRE, H., HAREL, J., ARNOULT, J. (1957). *Observations pendant la phase muette du développement intracellulaire du virus du fibrome de Shope, de corps d'inclusions diffus sans virus corpusculaire correspondant avec la présence d'un antigène soluble.* Bull. Cancer., 44, 92-105.

FENNER, F. (1968). *"The biology of animal viruses".* Academic Press. N.Y.

GAFFORD, L.G., RANDALL, C.C. (1967). *The high molecular weight of the fowl pox virus genome.* J. mol. Biol. 26, 303-310.

GARON, C.F., MOSS, B. (1971). *Glycoprotein synthesis in cells infected with vaccinia virus. II. A glycoprotein component of the virion.* Virology, 46, 233-246.

GAYLORD, W.H., MELNICK, J.L. (1953). *Intracellular forms of pox viruses as shown by the electron microscope (Vaccinia, Ectromelia, Molluscum contagiosum).* J. exper. Med., 98, 157-172.

GAYLORD, W.H., MELNICK, J.L. (1953). *Developmental forms of vaccinia virus.* Science, 117, 10-13.

GERSHENSON, S.M. (1957). *Le virus de la polyédrie de Galleria mellonella L.* Dokl. Acad. Nauk. SSSR. 113, 1161-1162.

GILES, K.W., MYERS, A. (1965). *An improved diphenylamine method for the estimation of deoxyribonucleic acid.* Nature, 206, 93.

GOLD, P., DALES, S. (1968). *Localization of nucleotide phosphohydrolase activity within vaccinia.* Proc. natl. Acac. Sci. U.S., 60, 845-852.

GOODWIN, R.H. (1968). *Use of the term virus inclusion body and vernacular virus names.* J. Invertebr. Pathol., 12, 449-450.

GOODWIN, R.H., FILSHIE, B.K. (1969). *Morphology and development of an occluded virus from the black-soil scarab Othnonius batesi.* J. Invertebr. Pathol., 13, 317-329.

GOTZ, P., HUGER, A.M., KRIEG, A. (1969). *Über sin Insektenpathogenes Virus aus der Gruppe der Pockenviren.* Naturwissenschaften, 56, 145-146.

GOURRET, J.P. (1970). *Ultrastructure et micro-écologie des mycoplasmes de phloème dans trois maladies des pétales verts. Etude des lésions cellulaires.* J. Microscopie, 9, 807-822.

GRANADOS, R.R. (1971). *Development of an insect pox virus in the nervous system of Estigmene acrea larvae.* Proc. IVth. Intern. Coll. on Insect Pathology, Maryland, U.S.A., 1970, 110-114.

GRANADOS, R.R., ROBERTS, D.W. (1970). *Electron microscopy of a poxlike virus infecting an invertebrate host.* Virology, 40, 230-243.

GREEN, M. (1962). *Studies on the biosynthesis of viral DNA.* Cold Spring Harbor Symp. quant. Biol., 27, 219-233.

GREEN, M., PINA, S., CHAGOYA, V. (1964). *Biochemical studies on adenovirus multiplication. V. Enzymes of deoxyribonucleic acid synthesis in cells infected by adenovirus and vaccinia virus.* J. biol. Chem., 239, 1188-1197.

GREGOIRE, A., L'HARDY,J.P.,de HARVEN, E. (1962). *Etude au microscope électronique d'une tumeur cutanée benigne associée à un virus du groupe Pox chez un passereau (Drunella modularis).* C.R. Acad. Sci., 254, 4369-4371.

GRIMLEY, P.M., MOSS, B. (1971). *Similar effect of rifampin and other rifamycin derivatives on vaccinia virus morphogenesis.* J. Virol., 8, 225-231.

GRIMLEY, P.M., ROSENBLUM, E.N., NIMS, S.J, MOSS, B. (1970). *Interruption by rifampin of an early stage in Vaccinia virus morphogenesis: accumulation of membranes which are precurssors of virus envelopes* J. Virol., 6, 519-533.

HANAFUSA, H. (1960). *Alterations of nucleic acid metabolism of host cells by active and inactivated forms of vaccinia virus.* Biken's J. 5, 313-327.

HARFORD, C.G., HAMLIN, A., RIEDERS, E. (1966). *Electron microscopic autoradiography of DNA synthesis in cells infected with vaccinia virus.* Exper. Cell Res., 42, 50-57.

HARRAP, K.A. (1970). *Cell infection by a nuclear polyhedrosis virus.* Virology, 42, 311-318.

HARRAP, K.A., TINSLEY, T.W. (1971). *A suggested latinized nomenclature of occluded insect viruses.* J. Invertebr. Pathol., 17, 294-296.

HARRAP, K.A., ROBERTSON, J.S. (1968). *A possible infection pathway in the development of a nuclear polyhedrosis virus.* J. gen. Virol., 3, 221-225.

HARRIS, W.J., WESTWOOD, J.C.N. (1964). *Phosphotungstate staining of vaccinia virus*. J. gen. Microbiol., 34, 491-495.

HENRY, J.E., JUTILA, J.W. (1966). *The isolation of a polyhedrosis virus from a grasshopper*. J. Invertebr. Pathol., 8, 417-418.

HENRY, J.E., NELSON, B.P., JUTILA, J.W. (1969). *Pathology and development of the grasshopper inclusion body virus in* Melanoplus sanguinipes J. Virol., 37, 605-610.

HERSHEY A.D., BURGI, E., CAIRNS, H.J.F., FRANKEL F., INGRAHAM, L. (1961). Yearb. Carnegie Instn. Wash., 60, 455. (Cité par JOKLIK, J. mol. Biol., 1962, 5, 265-274)

HERZBERG, K., KLEINSCHMIDT, A., LANG, D., REUSS, R. (1961). *Vaccine Virus und Kanarien pocken-virus elektronenmikroskopisch bei negativ-kontrastierung*. Naturwissenschaften, 48, 725-726.

HIGASHI, N., OZAKI, Y., ICHIMIYA, M. (1960). *Electron microscopy of pox-virus-to-cell adsorption and the ultrastructure of developmental forms of poxvirus*. J. Ultrastruct. Res., 3, 270-281.

HIMENO, M., ONODERA, K. (1969). *RNA isolated from polyhedra of a nuclear polyhedrosis of the silkworm*. J. Invertebr. Pathol., 13, 87-90.

HOAGLAND, C.L., SMADEL, J.E., RIVERS, T.M. (1940a). *Constituents of elementary bodies of vaccinia. I. Certain basic analyses and observations on lipid components of the virus*. J. exper. Med., 71, 737-750.

HOAGLAND, C.L., LAVIN, G.I., SMADEL, J.E., RIVERS, T.M. (1940b). *Constituent of elementary bodies of vaccinia. II. Properties of nucleic acid obtained from vaccinia virus*. J. exper. Med., 72, 139-147.

HOAGLAND, C.L., WARD, S.M., SMADEL, J.E., RIVERS, T.M. (1941a). *Constituents of elementary bodies of vaccinia. IV. Demonstration of copper in the purified virus*. J. exper. Med., 74, 69-80.

HOAGLAND, C.L., SMADEL, J.E., WARD, S.M., RIVERS, T.M. (1941b). *Constituents of elementary bodies of vaccinia. V. A flavin associated with the purified virus.* J. exper. Med., 74, 133-144.

HOLLOS, I., LOVAS, B. (1968). *The ultrastructure of vaccinia virus growing in the embryonated egg.* Acta microbiol. Acad. Sci. hung, 15, 269-284.

HOLOWCZAK, J.A. (1970). *Glycopeptides of vaccinia virus. I. Preliminary characterization and hexosamine content.* Virology, 42, 87-99.

HOLOWCZAK, J.A., JOKLIK, W.K. (1967a). *Studies on the structural protein of vaccinia virus. I. Structural protein of virions and cores.* Virology, 33, 717-725.

HOLOWCZAK, J.A., JOKLIK, W.K. (1967b). *Studies on the structural protein of vaccinia virus. II. Kinetics of the synthesis of individual groups of structural proteins.* Virology, 33, 726-739.

HUGER, A.M., KRIEG, A. (1968). *On spindle-shaped cytoplasmic inclusions associated with a nuclear polyhedrosis of Choristoneura murinana.* J. Invertebr. Pathol., 12, 461-462.

HUGER, A.M., KRIEG, A., EMSCHERMANN, P., GÖTZ, P. (1970). *Further studies on Polypoxvirus chironomi, an insect virus of the pox group isolated from the midge Chironomus luridus.* J. Invertebr. Pathol., 15, 253-261.

HURPIN, B. (1962). *Super-famille des Scarabaeoidea.* In *"Entomologie appliquée à l'agriculture"*. Edit. A.S. Balachowsky. Masson et Cie, vol. 1, pp. 24-204.

HURPIN, B. (1964). *Elevage des vers blancs ou larves de Melolontha melolontha L. (Coléoptère Scarabaeidae).* Rev. Pathol. vég. Entomol. agric. Fr., 43, 153-177.

HURPIN, B. (1968). *The influence of temperature and larval stage on certain diseases of Melolontha melolontha*. J. Invertebr. Pathol., 10, 252-262.

HURPIN, B., ROBERT, P. (1967). *Sur la spécificité de Vagoiavirus melolonthae*. Entomophaga, 12, 175-180.

HURPIN, B., ROBERT, P. (1969). *Recherches sur l'utilisation des Vagoiavirus melolonthae pour la lutte microbiologique contre les vers blancs*. Entomophaga, 14, 349-357.

HURPIN, B., VAGO, C. (1958). *Les maladies du hanneton commun (Melolontha melolontha L.) (Col. Scarabaeidae)*. Entomophaga, 3, 285-330.

HURPIN, B., VAGO, C. (1963). *Une maladie à inclusions cytoplasmiques fusiformes chez le Coléoptère Melolontha melolontha L.* Rev. Pathol. vég. Entomol. agri. Fr., 42, 115-117.

HYDE, J.M., GAFFORD, L.G., RANDALL, C. (1965). *Fine structure of the coat and nucleoid material of fowlpox virus*. J. Bacteriol., 89, 1557-1569.

HYDE, J.M., GAFFORD, L.G., RANDALL, C.C. (1967). *Molecular weight determination of fowlpox DNA by electron microscopy*. Virology, 33, 112-120.

HYDE, J.M., PETERS, D. (1970). *Organization of the fowlpox virus nucleoid* Int. Congr. Electr. Microsc., Grenoble, 1970, vol. III, 291-292.

HYDE, J.M., PETERS, D. (1971). *The organization of nucleoprotein within fowlpox virus*. J. Ultrastruct. Res., 35, 626-641.

ICHIHASHI, Y., MATSUMOTO, S. (1966). *Studies on the nature of marchal bodies. (A-type inclusion) during Ectromelia virus infection.* Virology, 29, 264-275.

ICHIHASHI, Y., MATSUMOTO, S. (1968). *The relationship between poxvirus and A-type inclusion body during double infection.* Virology, 36, 262-270.

ICHIHASHI, Y., MATSUMOTO, S., DALES, S. (1971). *Biogenesis of poxviruses : Role of A-type inclusions and host cell membranes in virus dissemination.* Virology, 46, 507-532.

JACQUEMONT, B., PRESCOSTA, P., GAUTHERON, D. (1969). *Isolement et quelques propriétés du DNA virus du fibrome de Shope.* Bull. Soc. Chim. biol., 51, 225-244.

JACQUEMONT, B., GRANDE, J., GAZZOLO, L., RICHARD, M.H. (1972). *Composition and size of Shope fibroma virus deoxyribonucleic acid.* J. Virol., 9, 836-841.

JOKLIK, W.K. (1962a). *The purification of four strains of poxvirus.* Virology, 18, 9-18.

JOKLIK, W.K. (1962b). *Some properties of poxvirus DNA.* J. mol. Biol., 5, 265-274.

JOKLIK, W.K. (1962c). *The preparation and characteristics of highly purified radio-actively labeled poxvirus.* Biochem. Biophys. Acta, 61, 290-301.

JOKLIK, W.K. (1964a). *The intracellular uncoating of poxvirus DNA. I. The fate of radioactively labeled rabbitpox virus.* J. mol. Biol. 8, 263-276.

JOKLIK, W.K. (1964b). *The intracellular uncoating of poxvirus DNA. II. The molecular basis of the uncoating process.* J. mol. Biol., 8, 277-288.

JOKLIK, W.K. (1966). *The poxviruses.* Bacteriol. Rev., 30, 33-66.

JOKLIK, W.K. (1968a). *The poxviruses.* Ann. Rev. Microbiol., 22, 359-390.

JOKLIK, W.K. (1968b). *The large DNA animal viruses : The poxvirus and herpesvirus group.* In *"Molecular Basis of Virology".* (H. FRAENKEL-CONTRAT, ed.), 576-623, Reinhold, New-York.

JOKLIK, W.K., BECKER, Y. (1964). *The replication and coating of vaccinia DNA.* J. mol. Biol., 10, 452-474.

JOKLIK, W.K., BECKER, Y. (1965). *Studies of the genesis of polyribosomes. II. The association of nascent messenger RNA with the 40S subribosomal particles.* J. mol. Biol., 13, 511-520.

JOKLIK, W.K., JUNGWIRTH, C., ODA, K., WOODSON, B. (1967). *Early and late functions during the vaccinia virus multiplication cycle.* In *"The molecular biology of viruses",* (J.S. Colter and W. Paranchych éd.), pp. 473-494. Acad. Press, New-York.

JUNGWIRTH, C., JOKLIK, W.K. (1965). *Studies on "early" enzymes in Hela cells infected with vaccinia virus.* Virology, 27, 80-93.

JUNGWIRTH, C., LAUNER, J.(1968). *Effect of poxvirus infection on host cell deoxyribonucleic acid synthesis.* J. Virol., 2, 401-408.

JUTISZ, M. (1960). *Acides aminés et Peptides.* In *"Chromatographie",* vol. *III.* Lederer Ed. (Masson et Cie, Paris 1960), 294-397.

KAJIOKA, R., SIMINOVITCH, L., DALES, S. (1964). *The cycle of multiplication of vaccinia virus in Earle's strain L Cells. II. Initiation of DNA synthesis and morphogenesis.* Virology, 24, 295-309.

KATES, J., BEESON, J. (1970). *Ribonucleic acid synthesis in vaccinia virus. I. The mechanism of synthesis and release of RNA in vaccinia virus.* J. mol. Biol., 50, 1-8.

KATES, J.R., Mc AUSLAN, B.R. (1967a). *Messenger RNA synthesis by a "coated" viral genome.* Proc. nation. Acad. Sci. U.S.A., 57, 314-320.

KATES, J.R., Mc AUSLAN, B.R. (1967b). *Poxvirus DNA dependent RNA polymerase.* Proc. nation. Acad. Sci. U.S.A., 58, 134-141.

KATES, J.R., DAHL, R., MIELKE, M. (1968). *Synthesis and intracellular localization of vaccinia virus deoxyribonucleic acid-dependent ribonucleic acid polymerase.* J. Virol. 2, 894-900.

KATO, S., HARA, M., MIYAMOTO, H., KAMAHORA, J. (1963). *Inclusion markers of cowpox and alastrium virus.* Biken's J., 6, 233-235.

KATO, S., HAGIWARA, K., KAMAHORA, J. (1955). *The mechanism of the growth of ectromelia virus propagated in the ascite tumor cells. I. Study on the inclusion bodies of ectromelia virus.* Med. J. Osaka Univ. 6, 39-50.

KATO, S., OGAWA, M., MIYAMOTO, H. (1964). *Nucleocytoplasmic interaction in poxvirus-infected cells. I. Relationship between inclusion formation and DNA metabolism of the cells.* Biken's J., 7, 45-56.

KATZ, E., MOSS, B. (1970a). *Formation of vaccinia virus structural polypeptide from a higher molecular weight precursor inhibition by rifampicin.* Proc. nation. Acad. Sci., 66, 677-684.

KATZ, E., MOSS, B. (1970b). *Vaccinia virus structural polypeptide derived from a high-molecular-weight precursor : formation and integration into virus particles.* J. Virol. 6, 717-726.

KAWASE, S. (1964). *The amino-acid composition of viruses and their polyhedron proteins of the polyhedroses of the silkworm, Bombyx mori (Linnaeus).* J. Insect Pathol., 6, 156-163.

KIRBY, K.S. (1957). *A new method for the isolation of DNA. Evidence of the nature of bonds between DNA and protein.* Biochem. J., 66, 495-504.

KIT, S., DUBBS, D.R. (1962). *Biochemistry of vaccinia-infected mouse fibroblasts (strain L.M.). I. Effects on nucleic acid and protein synthesis.* Virology, 18, 274-285.

KIT, S., BUBBS, D.R., PIEKARSKI, L.J. (1962). *Enhanced thymidin phosphorylating activity of mouse fibroblasts (strain LM) following vaccinia infection.* Biochem. biophys. Res. Commun., 8, 72-75.

LEDUC, E., BERNHARD, W. (1962). *Electron microscopic study of mouse liver infected by Ectromelia virus.* J. Ultrastruct. Res. 6, 466-488.

LEDUC, H.E., BERNHARD, W. (1967). *Recent modification of glycol methacrylate embedding procedure.* J. Ultrastruct. Res., 19, 196-199.

LEPINE, P., ATANASIU, P., CROISSANT, O. (1948). *Aspect au microscope électronique des inclusions de la variole aviaire (corps de Bollinger).* Ann. Inst. Pasteur, 75, 279-281.

LIPA, J.J., BARTKOWSKI, J. (1972). *A newly discovered poxlike virus disease of dung beetles, Geotrupes silvaticus (Coleoptera : Scarabaeidae).* J. Invertebr.Pathol. 20, 218-219.

LOH, P.C., RIGGS, J.L. (1961). *Demonstration of the sequential development of vaccinial antigens and virus in infected cells : observations with cytochemical and differential fluorescent procedures.* J. exper. Med., 114, 149-160.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J., (1951). *Protein measurement Folin phenol reagent.* J. biol. Chem., 193, 265-275.

LUFT, J.H. (1961). *Improvements in epoxy resin embedding methods.* J. biophys. biochem. Cytol., 9, 409-414.

LUFT, J.H. (1966). *Ruthenium red staining of the striated muscle cell membrane and the myotendinal junction.* 6th int. Congr. Electron Microscopy, Kyoto, 65-66.

LWOFF, A., ANDERSON, T.F., JACOB, F. (1959). *Remarques sur les caractéristiques de la particule virale infectieuse.* Ann. Inst. Pasteur, 97, 281-289.

LWOFF, A., TOURNIER, P. (1971). *Remarks on the classification of viruses.* In "Comparative Virology", K. Maramorosch et E. Kurstak edit. Academic Press New York, pp. 1-42.

McAUSLAN, B.R. (1965). *Deoxyribonuclease activity of normal and poxvirus-infected Hela cells.* Biochem. biophys. Res. Commun., 19, 15-20.

McAUSLAN, B.R., JOKLIK, W.K. (1962). *Stimulation of the thymidine phosphorylating system in HeLa cells on infection with poxvirus.* Biochem. Biophys. Res. Commun, 8, 486-491.

McAUSLAN, B.R., KATES, J.R. (1967). *Poxvirus-induced acid deoxyribonuclease : regulation of synthesis ; control of activity in vivo ; purification and properties of the enzyme.* Virology, 33, 709-716.

McCREA, J.F., LIPMAN, M.B. (1967). *Strandlength measurements of normal and 5-iodo 2'-deoxyuridine-treated vaccinia virus deoxyribonucleic acid released by the Kleinschmidt method.* J. Virol. 1, 1037-1044.

MAGEE, W.E., SHEEK, M.R., BURROUS, M.J. (1960). *The synthesis of vaccinial deoxyribonucleic acid.* Virology, 11, 296-299.

MAGEE, W.E., MILLER, O.V. (1967). *Immunological evidence for the appearance of a new DNA polymerase in cells infected with vaccinia virus.* Virology, 31, 64-69.

MARQUET, E., SOBEL, H.J. (1969). *Cristalline inclusions in the nuclear envelope and granular endoplasmic reticulum of the Fish-Spinal cord.* J. Cell Biol., 41, 774-785.

MATSUMOTO, S. (1958). *Electron microscope studies of ectromelia virus multiplication. V. Report of "studies on biology of inclusion bodies in viral disease".* Ann. Rep. Virus Res., Kyoto Univ. 1, 151-184.

MEDZON, E.L., BAUER, H. (1970). *Structural features of vaccinia virus revealed by negative staining, sectioning and freeze-etching.* Virology, 40, 860-867.

MEJBAUM, W.Z. (1939). *Über die bestimmung kleiner pentosemengen, insbesonder in derivaten der adenylsaüre.* Z. Physiol. Chem., 258, 117-120.

MEYNADIER, G., FOSSET, J., VAGO, C., DUTHOIT, J.L., BRES, N. (1968). *Une virose à inclusions ovoïdes chez un Lépidoptère.* Ann. Epiphyties, 19, 703-706.

MITCHINER, M.B. (1969). *The envelope of vaccinia and orf viruses : an electron-cytochemical investigation.* J. gen. Virol., 5, 211-220.

MONNERON, A., BERNHARD, W. (1966). *Action de certaines enzymes sur des tissus inclus en épon.* J. Microscopie, 5, 697-714.

MORGAN, C., ELLISON, S., ROSE, H., MOORE, D. (1954). *Structure and development of viruses observed in the electron microscope. II. Vaccinia and fowlpox viruses.* J. exper. Med., 100, 301-310.

MOORIS, O.N. (1962). *Studies on the causative agent and histopathology of a virus disease of the Western oak looper.* J. Insect Pathol., 4, 446-453.

MOORIS, O.N. (1966). *Histochemical changes in Melolontha melolontha (Linnaeus) (Coleoptera) infected by a new virus.* Canad. J. Microbiol., 12, 965-971.

MORRIS, O.N. (1971). *Metabolic changes in diseased insects. IV : Radioautographic studies on protein changes in nuclear polyedrosis, densonucleosis, and Tipula iridescent virus infections.* J. Invertebr. Pathol., 18, 191-206.

MOSS, B., KATZ, E. (1969). *Synthesis of vaccinia viral proteins in cytoplasmic extracts. II. Identification of early and late viral proteins.* J. Virol., 4, 596-602.

MOSS, B., KATZ, E. (1969). *Synthesis of vaccinia viral proteins in cytoplasmic extracts. II. Identification of early and late viral proteins.* J. Virol., 4, 596-602.

MÜLLER, G., PETERS, D. (1963). *Substrukturen des Vaccinevirus, dargestellt durch Negativkontrastierung.* Arch. ges. Virusforsch., 13, 435-451.

MUNYON, W.H., KIT, S. (1966). *Induction of cytoplasmic ribonucleic acid (RNA) synthesis in vaccinia-infected LM cells during inhibition of protein synthesis.* Virology, 29, 303-309.

MUNYON, W., PAOLETTI, E., GRACE, Jr., J.T. (1967). *RNA polymerase activity in purified infectious vaccinia virus.* Proc. Nation. Acad. Sci. U.S.A., 58, 2280-2288.

MUNYON, W., PAOLETTI, E., OSPINA, J., GRACE, Jr., J.T. (1968). *Nucleotide phosphohydrolase in purified vaccinia virus.* J. Virol., 2, 167-172.

NAGAYAMA, A., POGO, B.G.T., DALES, S. (1970). *Biogenesis of vaccinia : separation of early stages from maturation by means of rifampicin.* Virology, 40, 1039-1051.

NAGINGTON, J., HORNE, R.W. (1962). *Morphological studies of orf and vaccinia viruses.* Virology, 16, 248-260.

NAGINGTON, J., NEWTON, A., HORNE, R.W. (1964). *The structure of orf virus.* Virology, 23, 461-472.

NOYES, W.F. (1962a). *The surface fine structure of vaccinia virus.* Virology, 17, 282-287.

NOYES, W.F. (1962b). *Further studies on the structure of vaccinia virus.* Virology, 18, 511-516.

NOYES, W.F. (1965). *Observations on two pox-tumor viruses.* Virology, 25, 666-669.

ODA, K, JOKLIK, W.K. (1967). *Hybridization and sedimentation studies on "early" and "late" vaccinia messenger RNA.* J. mol. Biol., 27, 395-419.

OGUR, M., ROSEN, G. (1950). *The nucleic acids of plant tissues. I. The extraction and estimation of desoxypentose nucleic acid and pentose nucleic acid.* Arch. Biochem., 25, 262-276.

OLSEN, R.G., YOHN, D.S. (1970). *Immunodiffusion analysis of yaba pox-virus structural and associated antigens.* J. Virol., 5, 212-220.

PAOLETTI, E., MOSS, B. (1972). *Protein kinase and specific phosphate acceptor proteins associated with vaccinia virus cores.* J. Virol., 10, 417-424.

PATTRIZI, G., MIDDELKAMP, J.N. (1968). *Immature forms of vaccinia virus : morphological observations from thin sections of infected human skin.* Virology, 34, 189-192.

PENNINGTON, T.H., FOLLETT , A., SZILAGYI, F. (1970). *Events in vaccinia virus infected cells following the reversal of the antiviral action of rifampicin.* J. gen. Virol., 9, 225-237.

PENNINGTON, T.H., FOLLETT, E.A. (1971). *Inhibition of poxvirus maturation by rifamycin derivatives and related compounds.* J. Virol., 7, 821-829.

PETERS, D. (1956). *Morphology of resting vaccinia virus.* Nature, 178, 1453.

PETERS, D. (1958). *Struktur und Entwicklung der Pockenviren.* Internat. Congr. Electronmikr. 4th, Berlin, vol. 2, pp. 552-573, Springer, Berlin.

PETERS, D. (1966). *Electron microscopic studies on the localization of deoxyribonucleic acid inside of DNA viruses.* Proc. 6th Internat. Congr. Electron. Microsc., pp. 195-196, Mazuren, Kyoto.

PETERS, D., MÜLLER, G., GEISTER, R. (1962). *Zur Deutung sogenanuter "inkompletter" Formen bei der Negativkontrastierung von viren.* Archiv. ges. Virusforsch., 12, 437-440.

PETERS, D., BÜTTNER, D. (1964). *Das Triplett des Vaccinevirus nach Anwendung verschiedener Fixierungsmittel.* 3rd european regional Conf. Electron Microsc., Prague, vol. B, p. 377.

PETERS, D., BÜTTNER, D. (1965a). *Elektronenmikroscopische Untersuchungen zur lokalisierung der DNS im Core des Vaccinia-Virus.* Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk. Infektionkr. Hyg., 198, 287-292.

PETERS, D., BÜTTNER, D. (1965b). *The influence of various fixations on the appearance of viruses in thin sections. A study on adeno- and vaccinia viruses.* Lab. Invest., 14, 496-506.

PETERS, D., GIESE, H. (1969). *Electron microscopic localization of DNA in virus-infected cells.* Proc. Internat. Congr. Virol., 1st., 1968, p. 302, Karger, Basel.

PETERS, D., GIESE, H. (1970). *Detection of DNA in thin sections.* 7e Congr. Internat. Microsc. Electron., Grenoble, pp. 557-558.

PETERS, D., KÜPER, H. (1970). *Die Nucleoidstruktur des Molluscum contagiosum Virus während der Reifung.* Arch. ges. Virusforsch., 31, 137-151.

PETERS, D., MÜLLER, G. (1963). *The fine structure of the DNA containing core of vaccinia virus.* Virology, 21, 266-268.

PETERS, D., MÜLLER, G., BÜTTNER, D. (1964). *The fine structure of paravaccinia viruses*. Virology, 23, 609-611.

PETERS, D., STOECKENIUS, W. (1954). *Structural analogies of pox viruses and bacteria*. Nature, 174, 224.

PETERS, D., STOECKENIUS, W. (1954). *Elektronenoptische Untersuchungen über die Elementarkörperstruktur des Molluscum contagiosum-Virus*. Z. Tropenmed. Parasitol., 5, 329-341.

PLANTEROSE, D.N., NISIHIMURA, C., SALZMAN, N.P. (1962). *The purification of vaccinia virus from cell cultures*. Virology, 18, 294-301.

POGO, B.G.T., DALES, S. (1969a). *Two deoxyribonuclease activities within purified vaccinia virus*. Proc. Nation. Acad. Sci. U.S.A., 63, 820-827.

POGO, B.G.T., DALES, S. (1969b). *Regulation of the synthesis of nucleotide phosphohydrolase and neutral DNase : two activities present within purified vaccinia virus*. Proc. Nation. Acac. Sci., U.S.A., 63, 1297-1303.

POGO, B.G.T., DALES, S. (1971). *Biogenesis of vaccinia : Separation of early stages from maturation by means of hydroxyurea*. Virology, 43, 144-151.

QUIOT, J.M. (1971). *Cell culture of Coleoptera, Orthoptera and Dictyoptera*. In : *"Invertebrate Tissue Culture"*. Vol. 1. C. Vago édit. Academic Press, New-York, pp. 267-294.

RAMBOURG, (1967). *Detection des glycoproteines au microscope électronique : coloration de la surface cellulaire et de l'appareil de Golgi par un mélange acide chromique-phosphotungstique*. C.R. Acad. Sci., 265, 1426-1428.

RANDALL, C.C., GAFFORD, L.G. (1962). *Histochemical and biochemical studies of isolated viral inclusions*. Amer. J. Pathol., 40, 51-62.

RANDALL, C.C., GAFFORD, L.G., DARLINGTON, R.W., HYDE, J. (1964). *Composition of fowl pox virus and inclusion matric.* J. Bacteriol., 87, 939-944.

REYNOLDS, E.S. (1963). *The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy.* J. Cell Biol., 17, 208-212.

ROBERT, P. (1967). *Observations écologiques sur une virose cytoplasmique des larves du hanneton commun (Melolontha melolontha L.) (Col. Scarabaeidae).* Thèse d'ingénieur D.P.E. Paris.

ROBERT, P. (1969). *Etude en laboratoire de l'influence du stade larvaire de la quantité de virus et de la température sur la virose à vagoiavirus de Melolontha melolontha L. (Col. Scarabaeidae).* Ann. Zool. Ecol. anim., 1, 289-307.

ROBERTS, D.W., GRANADOS, R.R. (1968). *A poxlike virus from Amsacta moorei (Lepidoptera : Arctiidae).* J. Invertebr. Pathol., 12, 141-143.

ROBERTS, D.W., McCARTHY, W.S. (1972). *Partial characterization of virions and proteins of an entomopoxvirus from Lepidopterous insects.* In *Monographs in Virology"*, Tinsley and Harrap Edit., S. Karger, Basel, pp. 7-9.

RODRIGUEZ-BURGOS, A., CHORDI, A., DIAZ, R., TORMO, J. (1966). *Immunoelectrophoretic analysis of vaccinia virus.* Virology, 30, 569-572.

ROHRER, H., HOFFMANN, C. (1960). *Beitrag zur Vermebrungsweise des Ektromeliavirus.* Arch. exper. Vet. med., 14, 997-1021.

ROSENKRANZ, H.S., ROSE, H.M., MORGAN, C., HSU, K.C. (1966). *The effect of hydroxyures on virus development. II. Vaccinia virus.* Virology, 28, 510-519.

SALZMAN, N.P. (1960). *The rate of formation of vaccinia deoxyribonucleic acid and vaccinia virus.* Virology, 10, 150-152.

SALZMAN, N.P., SEBRING, E.D. (1967). *Sequential formation of vaccinia virus proteins and viral deoxyribonucleic acid replication.* J. Virol., 1, 16-23.

SALZMAN, N.P., SHATKIN, A.J., SEBRING, E.D. (1963). *Viral protein and DNA synthesis in vaccinia virus-infected Hela cells cultures.* Virology, 19, 542-550.

SALZMAN, N.P., SHATKIN, A.J., SEBRING, E.D. (1964). *The synthesis of a DNA-like RNA in the cytoplasm of Hela cells infected with vaccinia virus.* J. mol. Biol., 8, 405-416.

SALZMAN, N.P., SHATKIN, A.J., SEBRING, E.D., MUNYON, W. (1962). *On the replication of vaccinia virus.* Cold Spring. Harbor. Symp. quant. Biol., 27, 237-244.

SANDOZ, D., ULRICH, E., BRARD, E. (1971). *Etude des ultrastructures du magnum des oiseaux. I. Evolution au cours du cycle de ponte chez la poule Gallus domesticus.* J. Microscopie, 11, 371-400.

SAROV, I., BECKER, Y. (1967). *Studies on vaccinia virus DNA.* Virology, 33, 369-375.

SCHERRER, R. (1968). *Morphogénèse et ultrastructure du virus fibromateux de Shope.* Pathol. Microbiol., 31, 129-146.

SCHERRER, R. (1971). *Morphogénèse du virus du fibrome de Shope et sa perturbation par des températures supraoptimales.* Thèse Doct. Sci. nat., Paris, 127 pp.

SCHMIDT, G., TANNHAUSER, S.J. (1945). *A method for the determination of DNA, RNA, and phosphoproteins in animal tissues.* J. biol. Chem., 161, 83-89.

SCHNEIDER, W.C. (1945). *Phosphorus compounds in animal tissues. I. Extraction and estimation of desoxypentose nucleic acid and of pentose nucleic acid.* J. biol. Chem., 161, 293-303.

SCHWARTZ, J., DALES, S. (1971). *Biogenesis of poxvirus : Identification of four enzyme activities within purified yaha tumor virus.* Virology, 45, 797-801.

SEBRING, E.D., SALZMAN, N.P. (1967). *Metabolic properties of early and late vaccinia virus messenger ribonucleic acid.* J. Virol., 1, 550-558.

SELIGMAN, A.M., HANTER, J.S., WASSERKRUG, H., DMOCHOWSKI, H., KATZOFF, L. (1965). *Histochemical demonstration of some oxidized macromolecules with thiocarboxyhydrazide (T.C.H.) or thiosemicarbazide (T.S.C.) and osmium tetroxide.* J. Histochem. Cytochem. 13, 629-659.

SHATKIN, A.J. (1963). *The formation of vaccinia virus protein in the presence of 5-fluorodeoxyuridine.* Virology, 20, 292-301.

SHATKIN, A.J. (1969). *Colorimetric reactions for DNA, RNA and protein determination.* In *"Fundamental techniques in virology"*, K. Habel and N.P. Salzman ed., pp. 231-237, Academic Press, New-York.

SHVEDTCHIKOVA,N.G., TARASSEVITCH, L.M. (1966). *Les acides nucléiques isolés de granules de la granulose du Bombyx sibérien.* In *"La nature des virus"*, 181-184, Edt. "Nauka", Moscou.

SMADEL, J.E., HOAGLAND, C.L. (1942). *Elementary bodies of vaccinia.* Bacteriol. Rev., 6, 79-110.

SMADEL, J.E., LAVIN, G.I., DUBOS, R.J. (1940). *Some constituents of elementary bodies of vaccinia virus.* J. exper. Med., 71, 373-389.

SMIRNOFF, W.A. (1970). *Rhombohedral twisted cristalloids found in the cytoplasm of nuclear polyhedrosis infected larvae of the ugly-nest carterpillar.* Canad. J. Microbiol., 16, 906-907.

SMITH, K.M. (1967). *"Insect virology"*, 256 pp., Academic Press, New-York.

SPACKMAN, D.H., STEIN, W.H., MOORE, S. (1958). *Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids.* Anal. Chem., 30, 1190-1206.

SUMMERS, M.D. (1969). *Apparent in vivo pathway of granulosis virus invasion and infection.* J. Virol., 4, 188-190.

SUMMERS, M.D. (1971). *Electron microscopic observations on granulosis virus entry, uncoating and replication processus during infection in the midgut cells of Trichoplusia ni.* J. ultrastruct. Res., 35, 606-625.

SUTTER, G.R. (1972). *A pox virus of the army cutworm.* J. Invertebr. Pathol 19, 375-382.

STAIRS, R.G. (1964). *Selection of a strain of insect granulosis virus producing only cubic inclusion bodies.* Virology, 24, 520-521.

STOLTZ, D.B., SUMMERS, M.D. (1972). *Observations on the morphogenesis and structure of a hemocytic poxvirus in the midge Chironomus attenatus.* J. Ultrastruct. Res., 40, 581-598.

TANADA, Y., LEUTENEGER, R. (1970). *Multiplication of a granulosis virus larval midgut cells of Trichoplusia ni and possible pathways of invasion into the hemocoel.* J. Ultrastruct. Res., 30, 589-600.

TARASSEVITCH, L.M. (1946). *Les acides nucléiques des polyèdres du ver à soie* (en russe). Mikrobiologiya, 15, 337-340.

TARASSEVITCH, L.M., OULANOVA, E.F., SHVEDTCHIKOVA, N.G. (1966). *Le rôle du RNA des polyèdres contenant des virus DNA.* In *"La nature des virus"*, pp. 175-180 ; éd. "Nauka", Moscou.

THIERY, J.P. (1967). *Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique.* J. Microscopie, 6, 987-1018.

TSURUHARA, T. (1971). *Immature particle formation of Yaba pox virus studied by electron microscopy.* J. Nat. Cancer Inst., 47, 549-554.

TURNER, N.A., REDGWELL, R.J. (1966). *A mixed layer for separation of amino acids by thin-layer chromatography.* J. Chromatogr., 21, 129-132.

UDENFRIEND, S., PETERSON, R.E. (1957). *Essay of aromatic amino acids. III. Tryptophan.* In *"Methods in Enzymology"*, Colowick S.B. and Kaplan N.O. ed., Academic Press, Vol. III, 613-614.

VAGO, C. (1963). *A new type of insect virus.* J. Insect Pathol., 5, 275-276.

VAGO, C. (1972). *Invertebrate cell and organ culture in invertebrate pathology.* In *"Invertebrate Tissue Culture"*, Vol. II, C. Vago ed., Academic Press, 245-278.

VAGO, C., AMARGIER, A. (1963). *Coloration histologique pour la différenciation des corps d'inclusion polyédriques de virus d'insectes.* Ann. Epiphyties, 14, 269-274.

VAGO, C., CROISSANT, O. (1964). *Etude morphologique du virus de la maladie à fuseaux des Coléoptères.* Entomophaga, 9, 207-210.

VAGO, C., QUIOT, J.M. (1969). *Recherche sur la composition des milieux pour culture de cellules d'invertébrés.* Ann. Zool. Ecol. anim., 1, 281-288.

VAGO, C., QUIOT, J.M. LUCIANI, J. (1968). *Cultures de cellules cardiaques d'arthropodes.* AttI 2e Coll. Internaz. Cult. Tessuto Invertebrate, Milano, pp. 110-118.

VAGO, C., AMARGIER, A., HURPIN, B., MEYNADIER, G., DUTHOIT, J.L. (1968). *Virose à fuseaux d'un Scarabeide d'Amérique du Sud.* Entomophaga, 13, 373-376.

VAGO, C., MONSARRAT, P. DUTHOIT, J.L., AMARGIER, A., MEYNADIER, G., WAEREBEKE, D.V. (1968). *Nouvelle virose à fuseaux observée chez un Lucanide (Coleoptera) de Madagascar.* C.R. Acad. Sci. 266, 1621-1623.

VAGO, C., ROBERT, P. AMARGIER, A., DUTHOIT, J.L. (1969). *Nouvelle virose à sphéroïdes et à fuseaux observée chez le Coléoptère Phyllopertha horticola L.* Mikroskopie, 25, 378-386.

WALEN, K.H. (1971). *Nuclear involvement in poxvirus infection.* Proc. Nation. Acad. Sci. U.S.A., 68, 165-168.

WEISER, J. (1949). *Deux nouvelles infections à virus des insectes.* Ann. Parasitol., 24, 259-264.

WEISER, J. (1965). *Vagoiavirus gen. n., a virus causing disease in insects.* J. Invertebr. Pathol., 7, 82-85.

WEISER, J. (1969). *A pox like virus in the midge Camptochironomus tentas.* Acta Virol., 13, 549-543.

WEISER, J., VAGO, C. (1966). *A newly described virus of the winter moth, Operophtera brumata Hübner (Lepidoptera, Geometridae).* J. Invertebr. Pathol., 8, 314-319.

WEISER, J., ZIZKA, Z. (1967). *Elektronenmikroskopische Untersuchung alter Virus-Materialien.* Mikroskopie, 22, 336-340.

WELLINGTON, E.F. (1951). *Amino-acids of two insect viruses.* Biochim. Biophys. Acta, 7, 238-243.

WELLINGTON, E.F. (1954). *The amino-acid composition of some insect viruses and their characteristic inclusion body proteins.* Biochem. J., 57, 334-338.

WESTWOOD, J.C.N., HARRIS, W.J., ZWARTOUW, H.T., TITMUSS, D.H., APPLEYARD, G. (1964). *Studies on the structure of vaccinia virus.* J. gen. Microbiol., 34, 67-78.

WESTWWOD, J.C.N., ZWARTOUW, H.T., APPLEYARD, G., TITMUSS, D.H.J. (1965). *Comparison of the soluble antigens and virus particle antigens of vaccinia virus.* J. gen. Microbiol., 38, 47-53.

WILCOX, W.C., COHEN, G.H. (1967). *Soluble antigens of vaccinia-infected mammalian cells. II. Time course of synthesis of soluble antigens and virus structural proteins.* J. Virol., 1, 500-508.

WILDY, P. (1971). *Classification and nomenclature of viruses. "Monographs in Virology"*, Vol. 5, J.L. Melnick Edit., S. Karger Publish.

WOODROOFE, G.M., FENNER, F. (1962). *Serological relationships within the pox-virus group : an antigen common to all members of the group.* Virology, 16, 334-341.

WOODSON, B., (1967). *Vaccinia in RNA systhesis under conditions which prevent uncoating.* Biochem. biophys. Res. Commun., 27, 169-175.

WOODSON, B., JOKLIK, W.K. (1965). *The inhibition of vaccinia virus multiplication by istain- -thiosemicarbazone.* Proc. nation. Acad. Sci. U.S.A., 59, 946-953.

YAGI, Y., IWASAKI, T., KATO, S. (1951). *Recherches chimiques sur le polyèdre du ver à soie (Bombyx mori L.) atteint de la grasserie.* Rev. Ver à soie, 3, 259-266..

YOHN, D.S., GALLAGHER, J.F. (1969). *Some physiochemical properties of Yaba pox virus deoxyribonucleic acid.* J. Virol., 3, 114-118.

YOSHITAKE, N., ARUGA, H. (1951). *On the amino acids in the polyhedral body of the grasserie of the silkworm.* J. Sericult., 20, 267.

ZWARTOUW, H.T. (1964). *The chemical composition of vaccinia virus.* J. gen. Microbiol., 34, 115-128.

ZWARTOUW, H.T., WESTWOOD, J.C.N. et HARRIS, W.J. (1965). *Antigens from vaccinia virus particles.* J. gen. Microbiol. 38, 39-45.

ANNEXE BIBLIOGRAPHIQUE

LISTE DES PUBLICATIONS DE L'AUTEUR AYANT TRAIT AU SUJET DE CETTE THESE

BERGOIN, M. (1966). *Recherches sur la dissémination des germes entomopathogènes ingérés par des Orthoptères et des Dictyoptères prédateurs et détritivoires*. Thèse Spéc., Marseille, 136 pp.

BERGOIN, M., SCALLA, R., DUTHOIT, J.L., VAGO, C. (1967). *Mise en évidence de vagoiavirus en microscopie électronique après dissolution des corps d'inclusion*. Proc. Colloq. Insect Pathol. micr. Control. Wagoningen, pp. 63-68.

BERGOIN, M., DEVAUCHELLE, G., DUTHOIT, J.L., VAGO, C. (1968). *Etude au microscope électronique des inclusions de la virose à fuseaux des Coléoptères*. C.R. Acad. Sci., 266, 2126-2128.

BERGOIN, M., DEVAUCHELLE, G., VAGO, C. (1968). *Observations au microscope électronique sur le développement du virus de la maladie à fuseaux du coléoptère Melolontha melolontha L.* C. R. Acad. Sci., 267, 382-385.

VAGO, C., BERGOIN, M. (1968). *Viruses of invertebrates*. In *"Advances in virus research"*. Vol. 13, K.M. Smith et M.A. Laufer édit., 247-303

BERGOIN, M., DEVAUCHELLE, G., VAGO, C. (1969). *Electron microscopy study of the pox-like virus of Melolontha melolontha L. (Coleoptera Scarabeidae)* . Arch. ges. Virusforsch., 28, 286-302.

BERGOIN, M. VEYRUNES, J.C., VAGO, C. (1969). *La nature de l'acide nucléique et l'affinité avec le groupe "Pox" du virus de la "Maladie à fuseau" du coléoptère Melolontha melolontha L. Proposition de classification*. C.R. Acad. Sci., 269, 1464-1466.

BERGOIN, M., VAGO, C. (1969). *Pox-like viruses in insects.* In *International virology"*, vol. 1, J.L. Melnick édit., 279-280, S. Karger, Basel.

BERGOIN, M., VEYRUNES, J.C., SCALLA, R. (1970). *Isolation and amino-acid composition of the inclusions of Melolontha melolontha poxvirus.* Virology, 40, 760-763.

DEVAUCHELLE, G., BERGOIN, M., VAGO, C. (1970). *Phénomène de "release" d'un entomopoxvirus observé dans les hémocytes de son hôte.* C.R. Acad. Sci., 271, 1138-1140.

BERGOIN, M., DEVAUCHELLE, G., VAGO, C. (1971). *Electron microscopy study of Melolontha melolontha poxvirus : the fine structure of occluded virions.* Virology, 43, 453-467.

POCO, B.G.T., DALES, S., BERGOIN, M., ROBERTS, D.W. (1971). *Enzymes associated with an insect poxvirus.* Virology, 43, 306-309.

BERGOIN, M., DALES, S. (1971). *Comparative observations on poxviruses of invertebrates and vertebrates.* In *"Comparative virology"*. K. Maramorosch and E. Kurstak ed., 169-205. Academic Press, New-York.

DEVAUCHELLE, C., BERGOIN, M., VAGO, C. (1971). *Etude ultrastructurale du cycle de replication d'un entomopoxvirus dans les hémocytes de son hôte.* J. Ultrastruct. Res., 37, 301-321.

ROBERTS, D.W., BERGOIN, M. (1971). *Purification and characterization of an insectpox virus of Lepidoptera.* Proc. 4th internat. Colloc. Insect Pathol., College York, U.S.A., 381-385.

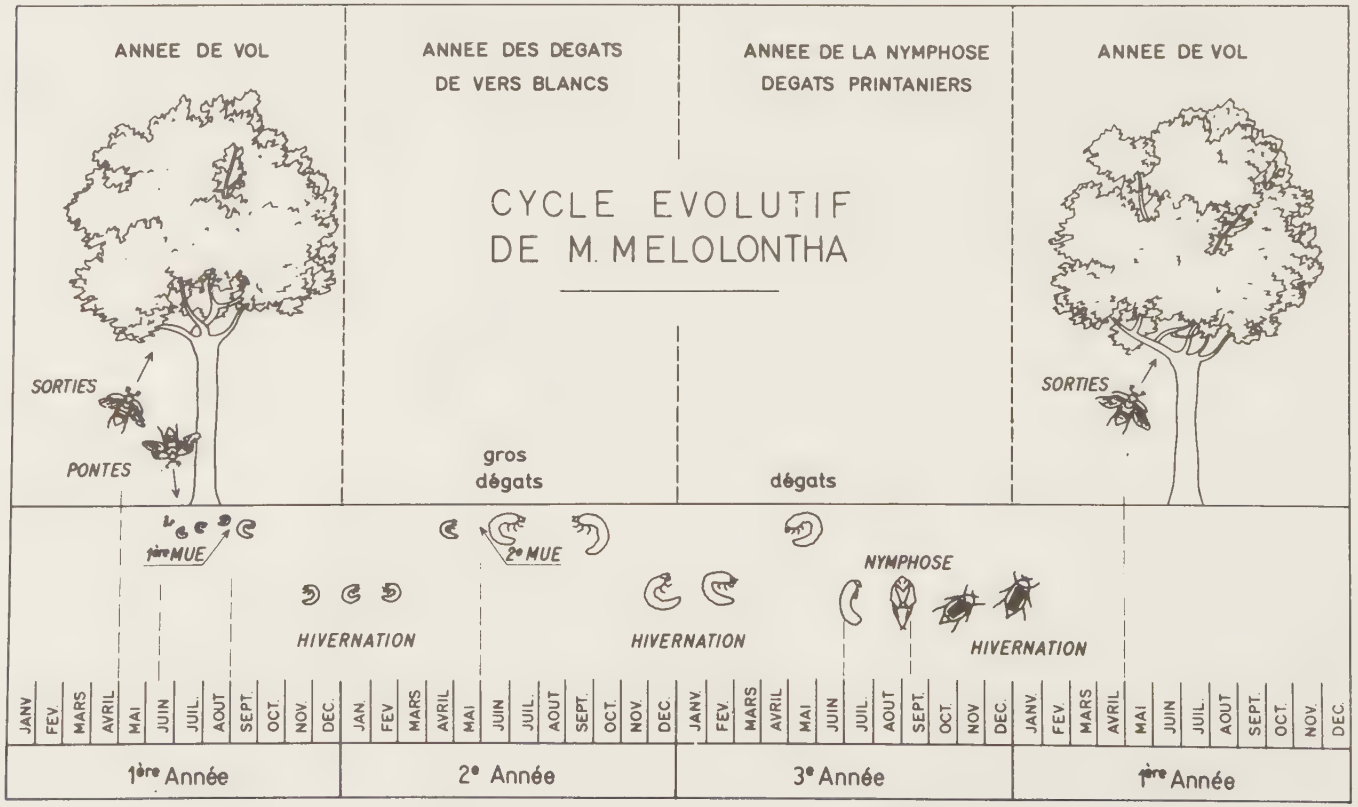
BERGOIN, M., DEVAUCHELLE, G. (1972). *Invertebrate poxviruses.* In *"Monographs in Virology"*, Vol. 6. T.W. Tinsley and K.A. Harrap, édit. 3-7, S. Karger, Basel.

BERGOIN, M., DEVAUCHELLE, G., VAGO, C. (sous presse). *Les inclusions fusiformes associées à l'entomopoxvirus du coléoptère Melolontha melolontha.*

PLANCHES HORS-TEXTE

P L A N C H E I

Fig. 1 : Schéma du cycle du hanneton commun, *Melolontha melolontha* L., dans la nature. D'après HURPIN (1962).


ANNEE DE VOL
ANNEE DES DEGATS DE VERS BLANCS
ANNEE DE LA NYMPHOSE DEGATS PRINTANIERS
ANNEE DE VOL
CYCLE EVOLUTIF DE M. MELOLONTHA
SORTIES
PONTES
gros dégats
dégats
SORTIES
1ère MUE
2e MUE
NYMPHOSE
HIVERNATION
HIVERNATION
HIVERNATION
JANV. FEV. MARS AVRIL MAI JUIN JUIL. AOUT SEPT. OCT. NOV. DEC.
1ère Année
2e Année
3e Année
1ère Année

1

P L A N C H E II

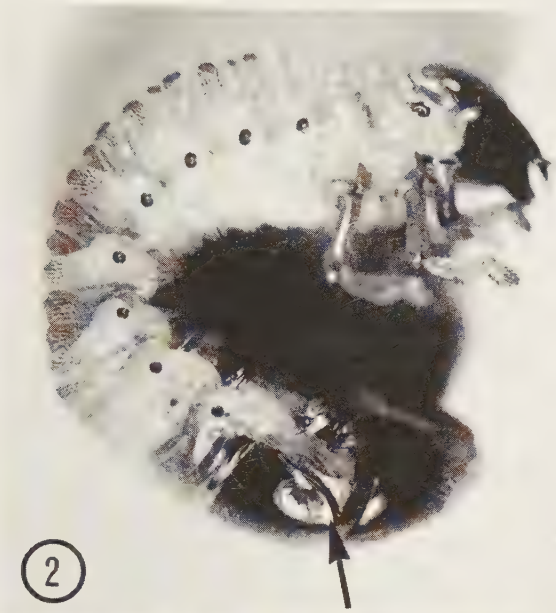
Aspect externe et histologie comparée des larves de *M. melolontha* saines et infectées par l'entomopoxvirus.

Fig. 2 : Larve saine au troisième stade. L'ampoule rectale brunâtre (flèche) est nettement visible à travers la cuticule du pygidium.
X 2,2

Fig. 3 : Larve du troisième stade présentant les symptômes caractéristiques de la virose, notamment l'opacité de la région pygidiale due à l'accumulation de fragments de tissu adipeux (flèche).
X 2,2

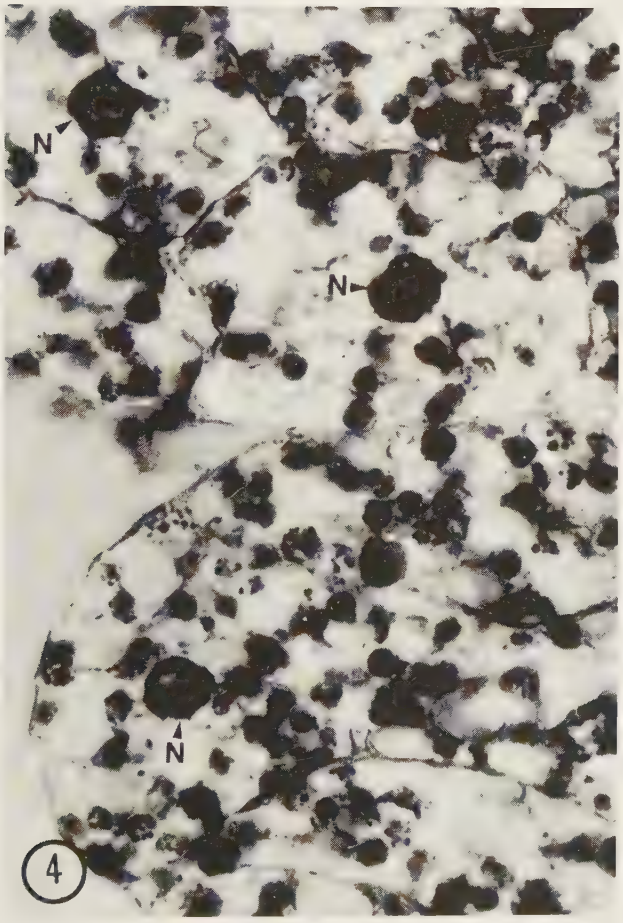
Fig. 4 : Coupe histologique dans deux lobes contigus de tissu adipeux sain. Les noyaux (N) petits et ronds sont riches en matériel chromatinien. Le cytoplasme renferme de nombreuses enclaves lipidiques et protéiniques. Coloration VAGO-AMARGIER.
X 1.200

Fig. 5 : Coupe histologique dans un lobe de tissu adipeux fortement atteint. L'organisation typique des cellules saines (Fig. 4) a disparu. Les noyaux (N) hypertrophiés ont perdu leur chromatine. Le cytoplasme renferme de nombreuses inclusions fusiformes, appelées fuseaux (F) et des inclusions parasphériques, appelées sphérules (S). Coloration VAGO-AMARGIER.
X 1.200

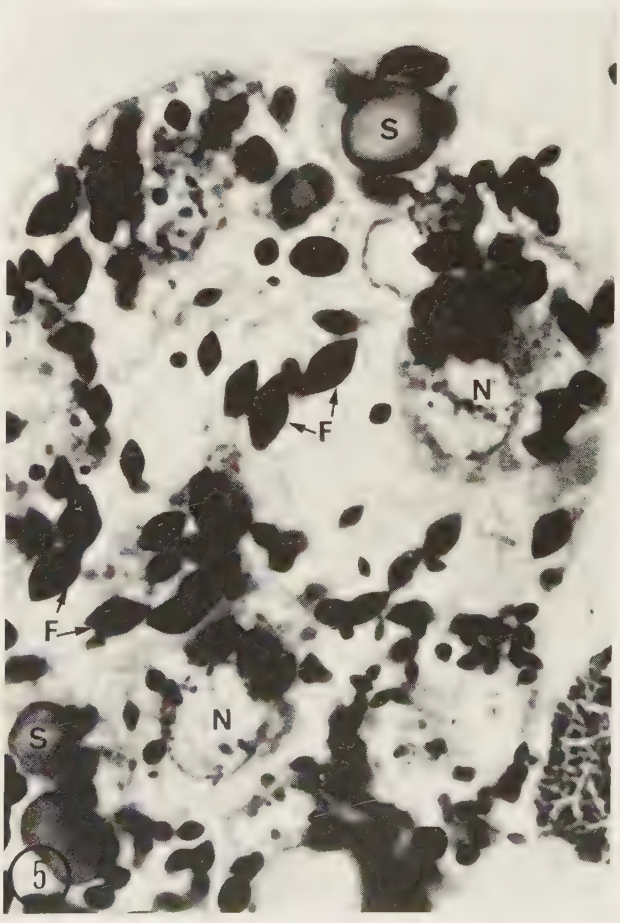


2

3



4



5

P L A N C H E III

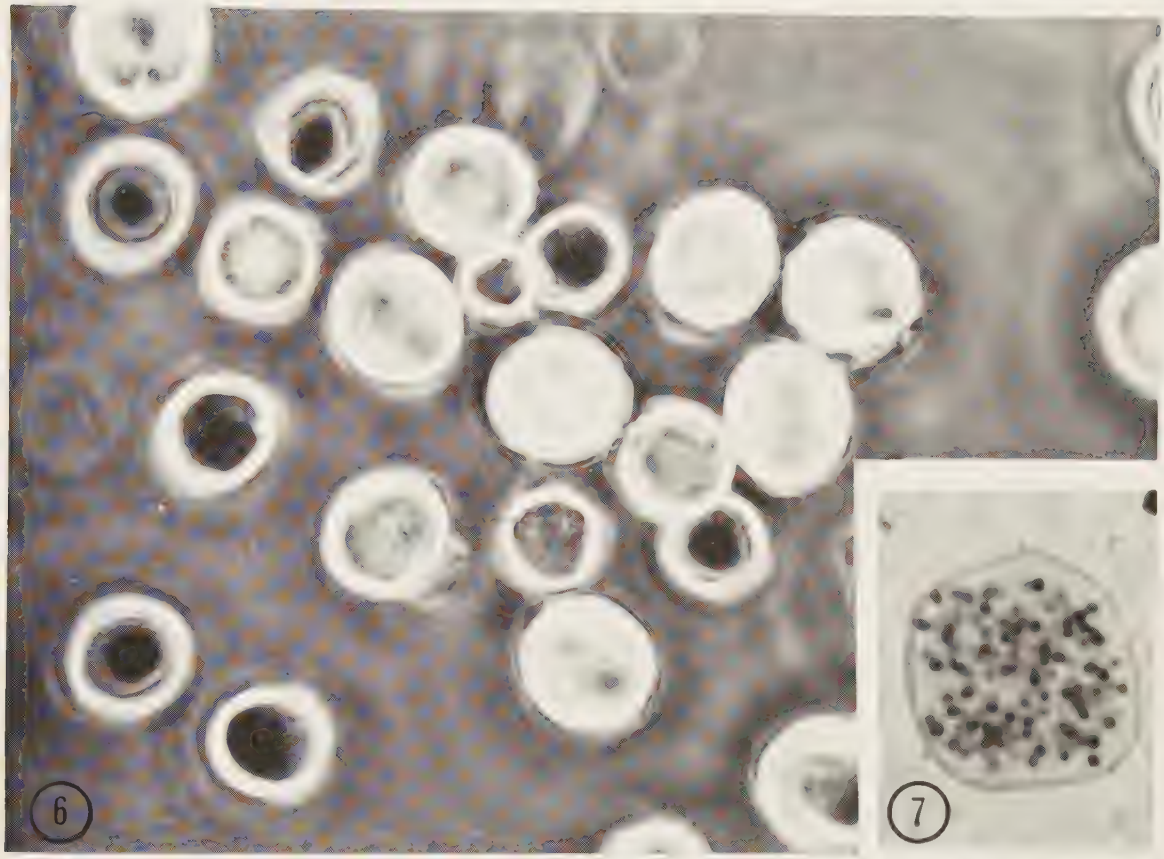
Sphérules observées au microscope photonique.

Fig. 6 : Suspension de sphérules observées en fond clair.
X 1.000

Fig. 7 : Coupe semi-fine de sphérule. Les virions qu'elle contient apparaissent comme de petites granulations localisées dans la zone centrale de l'inclusion, la zone périphérique en étant dépourvue. Inclusion épon ; coloration bleu de toluidine.
X 2.000

Fig. 8 : Sphérule observée en fond clair à fort grossissement. On notera au centre de l'inclusion des granulations disposées en alignements radiaires.
X 2.600

Fig. 9 : Sphérules ayant pris la forme "citron" après traitement par la soude 0,1 M. La matrice de la sphérule s'est éclaircie et les virions qu'elle renferme apparaissent sous forme de granulations réfringentes dans la zone centrale. La zone corticale de l'inclusion ne contient pas de virions.
X 2.600


6

7

8

9

PLANCHE IV

Fuseaux observés au microscope photonique
en fond clair

Fig. 10 : Suspension de fuseaux normaux. Noter leurs contours réguliers et leurs proportions semblables, quelle que soit leur taille.
X 1.800

Fig. 11 à 14 : Différents types d'inclusions complexes. Inclusion en forme d'étoile (Fig. 11) ; fuseau avec une branche latérale (Fig. 12) ; inclusion donnant l'image de 2 fuseaux accolés selon leur grand axe (Fig. 13) ; inclusion à cinq branches orientées selon différents plans (Fig. 14).
X 2.200

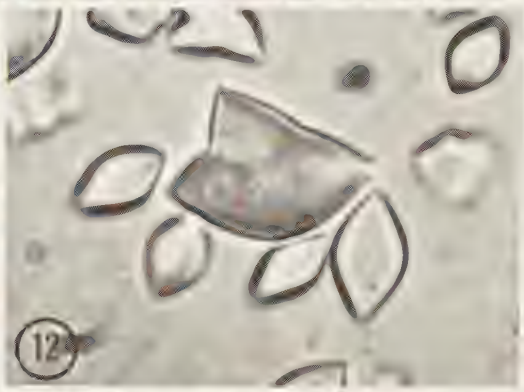
Fig. 15 et 16 : Premiers stades de la dissolution des inclusions complexes en milieu alcalin réducteur (thioglycolate 0,1 M + bicarbonate 0,1 M amené à pH 10,2 avec de la soude).

Fig. 15 : Inclusions à trois branches en voie de dissolution, les trois éléments de la "macle" sont dissociés selon leurs plans de contact (voir aussi Fig. 31, Pl. X). Contrairement à cette dissociation spécifique, les deux fuseaux normaux visibles dans le champ se fragmentent au hasard.
X 2.200

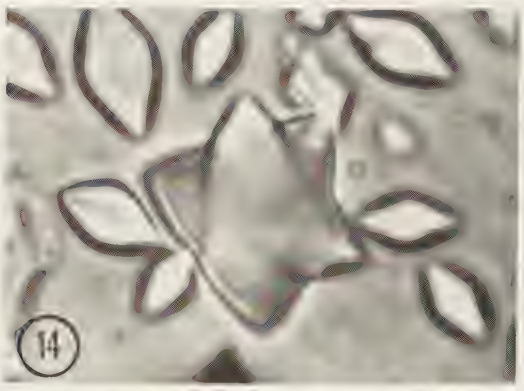
Fig. 16 : Dissociation d'une "macle" en étoile. Comme pour la figure précédente, les éléments de la "macle" se clivent selon leurs plans de contact.
X 2.200

10

11


12

13


14

15

16

P L A N C H E V

Sphérules observées au microscope électronique
à balayage.

Fig. 17 : Sphérule à surface rugueuse. Ce type de sphérule correspond à des inclusions ayant achevé leur maturation.
X 4.000

Fig. 18 : Sphérule dont la surface est recouverte de petits "cratères" (flèches) qui correspondent à l'emplacement des virions dans les inclusions immatures.
X 4.000

Fig. 19 et 20 : Certaines sphérules (voir également Fig. 21, Pl. VI) présentent un gros "cratère" central semblant correspondre à un effondrement de l'inclusion.
Fig. 19 : X 3.200
Fig. 20 : X 4.000

17

18

19

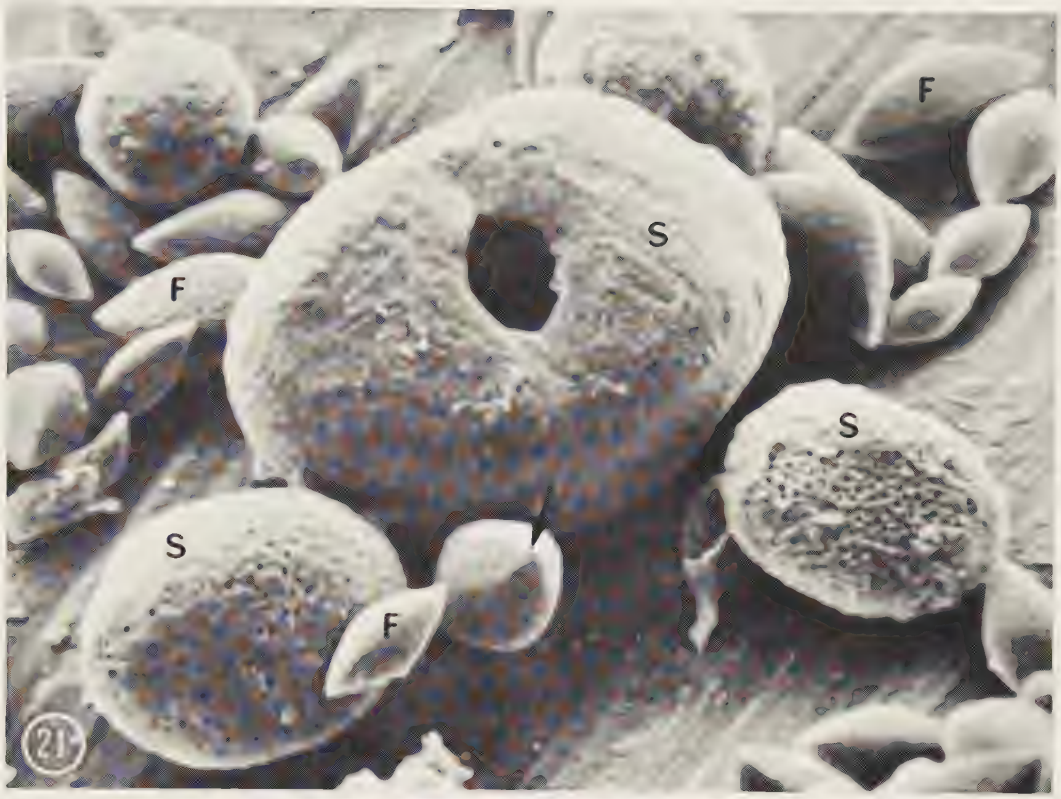
P L A N C H E VI

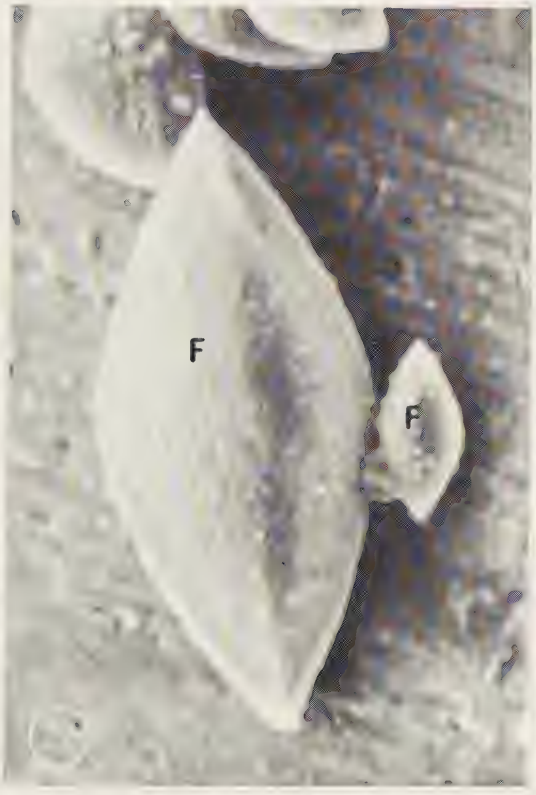
Inclusions observées au microscope électronique
à balayage.

Fig. 21 : Vue d'ensemble d'un mélange de fuseaux (F) et de sphérules (S). La flèche indique un fuseau en vue apicale dont on distingue nettement les 4 arêtes longitudinales partant du sommet.
X 3.400

Fig. 22 : Fuseau à fort grossissement. En dehors de quelques granulations éparses (probablement des impuretés) la surface du fuseau est uniformément lisse. Les arêtes partant des sommets s'estompent dans la partie renflée.
X 6.500

Fig. 23 et 24 : Inclusions complexes en forme d'étoile et avec une branche latérale. Les zones de contact des différents éléments de la "macle" sont soulignées par de légères dépressions (flèches).
Fig. 23 : X 5.200
Fig. 24 : X 4.200


F
S
F
S
S
F
21


F
F

23

F
24

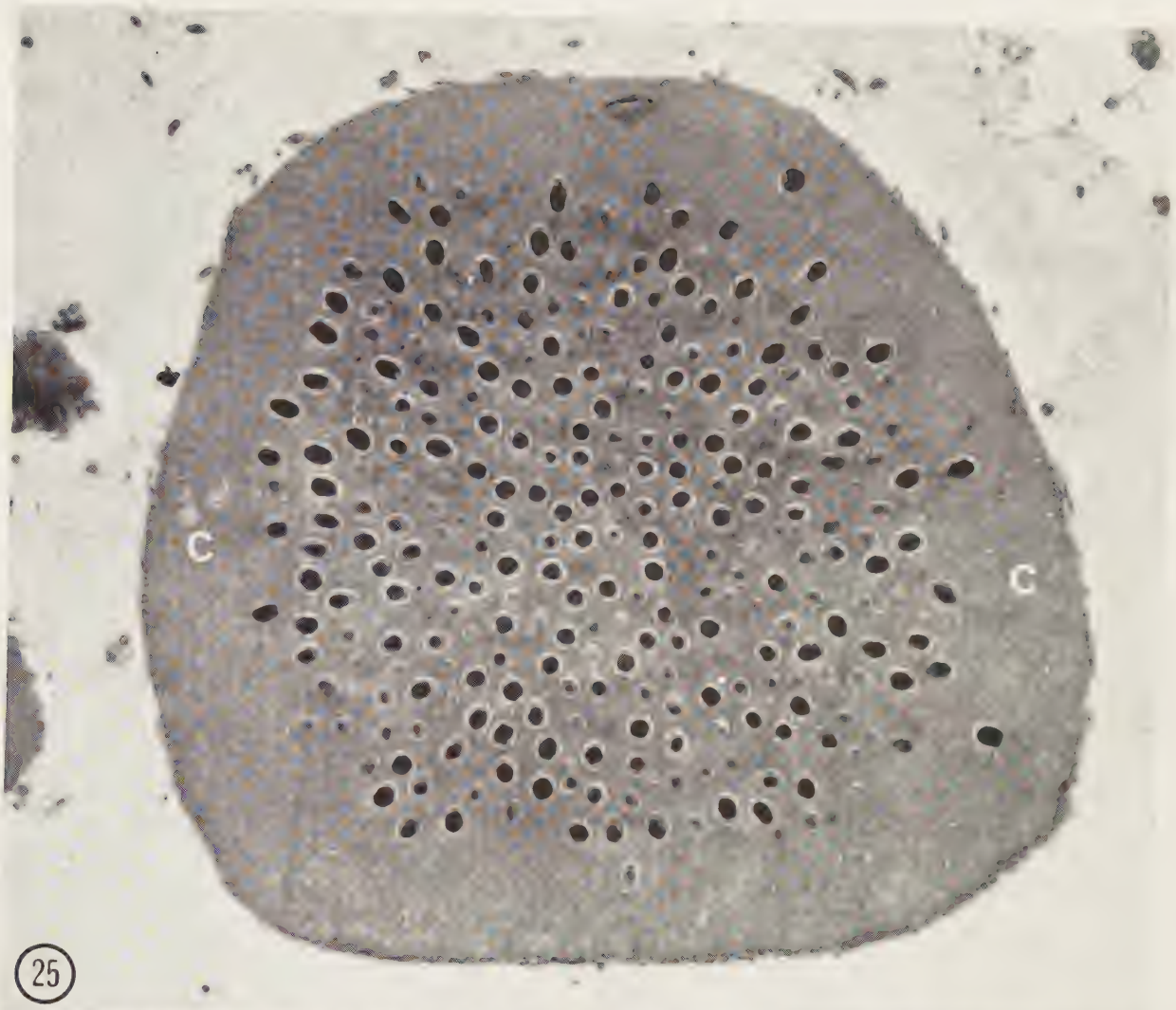
P L A N C H E VII

Ultrastructure des sphérules.

Fig. 25 : Section d'une sphérule mature photographiée à faible grossissement montrant l'arrangement des virions à l'intérieur de l'inclusion. Ces derniers sont régulièrement espacés les uns des autres et disposés en travées rayonnantes. La zone corticale (C) est dépourvue de virions.
X 13.000

Fig. 26 : A fort grossissement, la substance fondamentale des sphérules se résout en une fine trame cristalline de 55 ± 5 Å de périodicité. La trame est interrompue au niveau des virions (V) mais sa direction n'est pas perturbée.

X 350.000



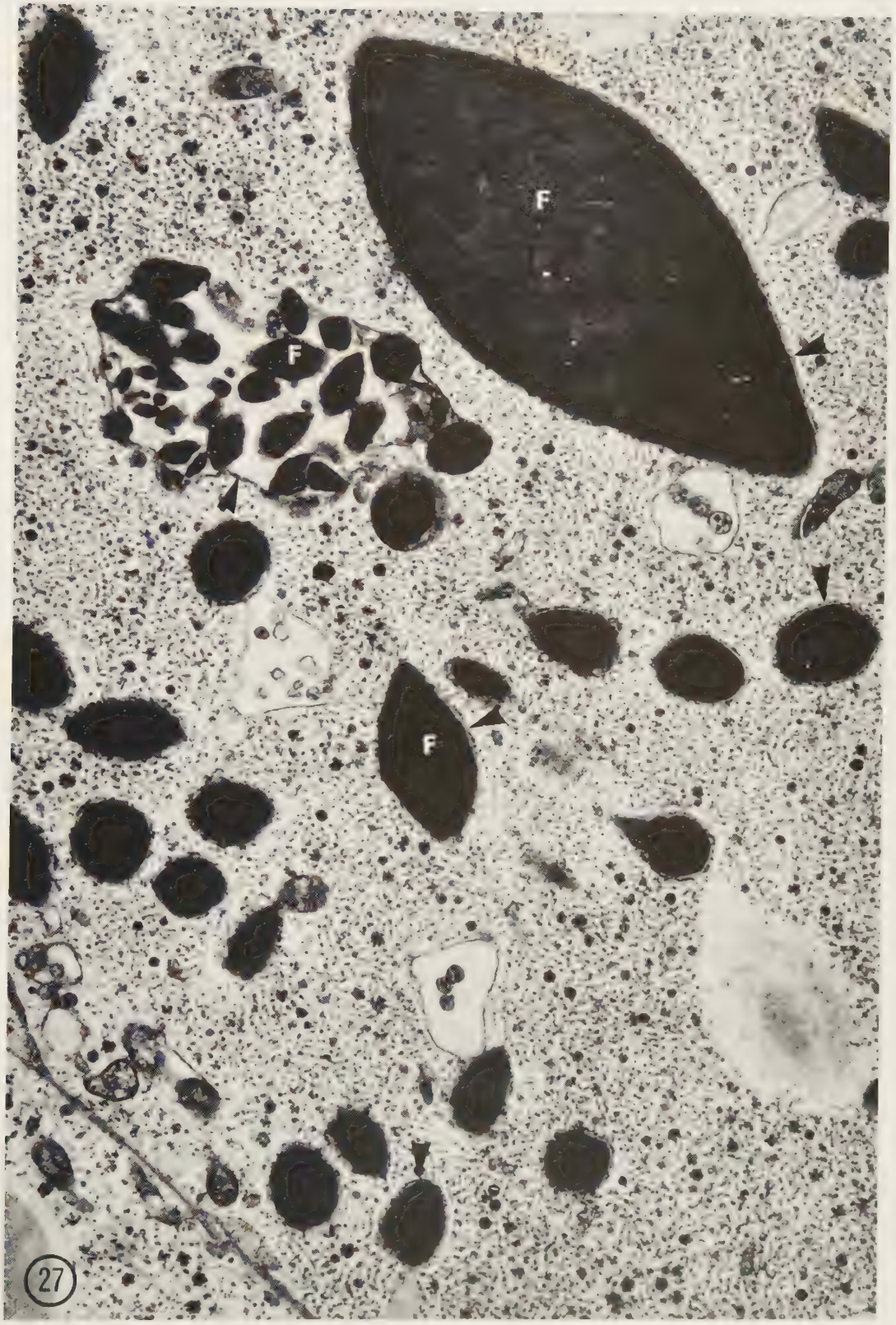
25

26

P L A N C H E VIII

Ultrastructure des fuseaux normaux.

Fig. 27 : Vue d'ensemble d'une plage cytoplasmique de cellule adipeuse contenant de nombreux fuseaux (F) de taille variée. Ils sont tous entourés d'une membrane de réticulum endoplasmique (flèches). En haut de la figure et à gauche, plusieurs petits fuseaux sont enfermés dans un complexe membranaire.
X 15.000


F
F
F
27

P L A N C H E IX

Ultrastructure des fuseaux normaux.

Fig. 28 : Section longitudinale d'un fuseau (F). Une citerne ergastoplasmique entoure l'inclusion (flèche).
X 60.000

Fig. 29 : Détail de la structure d'un fuseau à fort grossissement. La trame cristalline avec orientation des molécules selon deux directions (flèches) peut être suivie jusqu'au bord du cristal. re : réticulum endoplasmique limitant le fuseau.
x 350.000

F
28

re
29

P L A N C H E X

Ultrastructure des inclusions complexes.

Fig. 30 : Section dans une inclusion en étoile selon un plan oblique donnant une image asymétrique des 4 éléments constituant la "macle".
X 30.000

Fig. 31 : Détail à fort grossissement d'une section dans une inclusion complexe montrant le changement de direction de la trame cristalline de deux éléments adjacents au niveau de leur plan de contact (flèches longues). La dépression observée à la surface à ce niveau (flèche courte) correspond à celles observées au microscope à balayage (voir Fig. 23 et 24, Pl. VI).
X 170.000

30

31

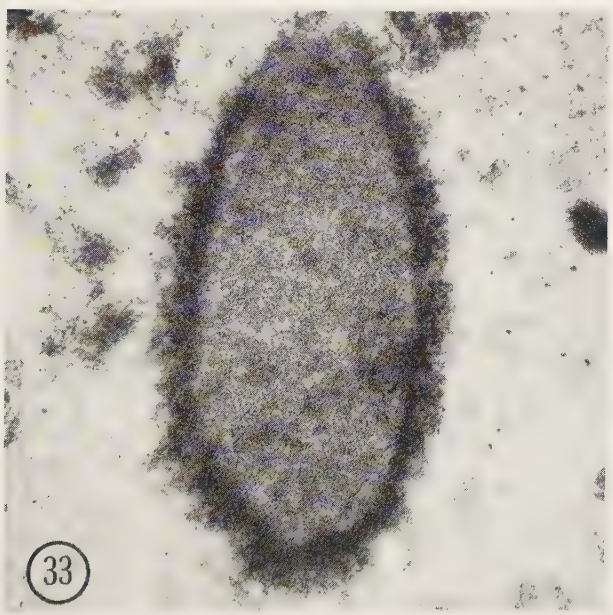
P L A N C H E XI

Digestions enzymatiques de fuseaux
sur coupes ultra-fines en GMA.

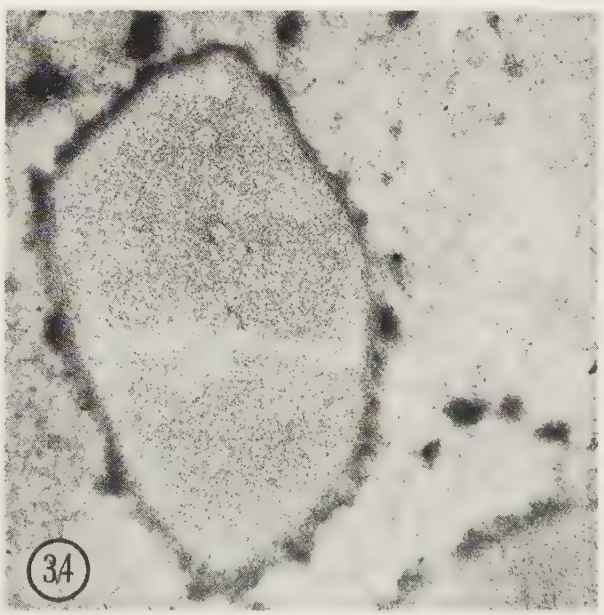
Fig. 32 : Section de fuseaux incubée pendant 30 minutes dans une solution de pepsine à 0,1 %. Il ne reste pratiquement plus rien des fuseaux.
X 17.000

Fig. 33 et 34 : Sections de fuseaux incubées pendant 10 minutes (Fig. 33) et 30 minutes (Fig. 34) dans une solution de pronase à 0,1 %. La substance fondamentale des fuseaux est progressivement digérée.
X 35.000

32



33



34

P L A N C H E XII

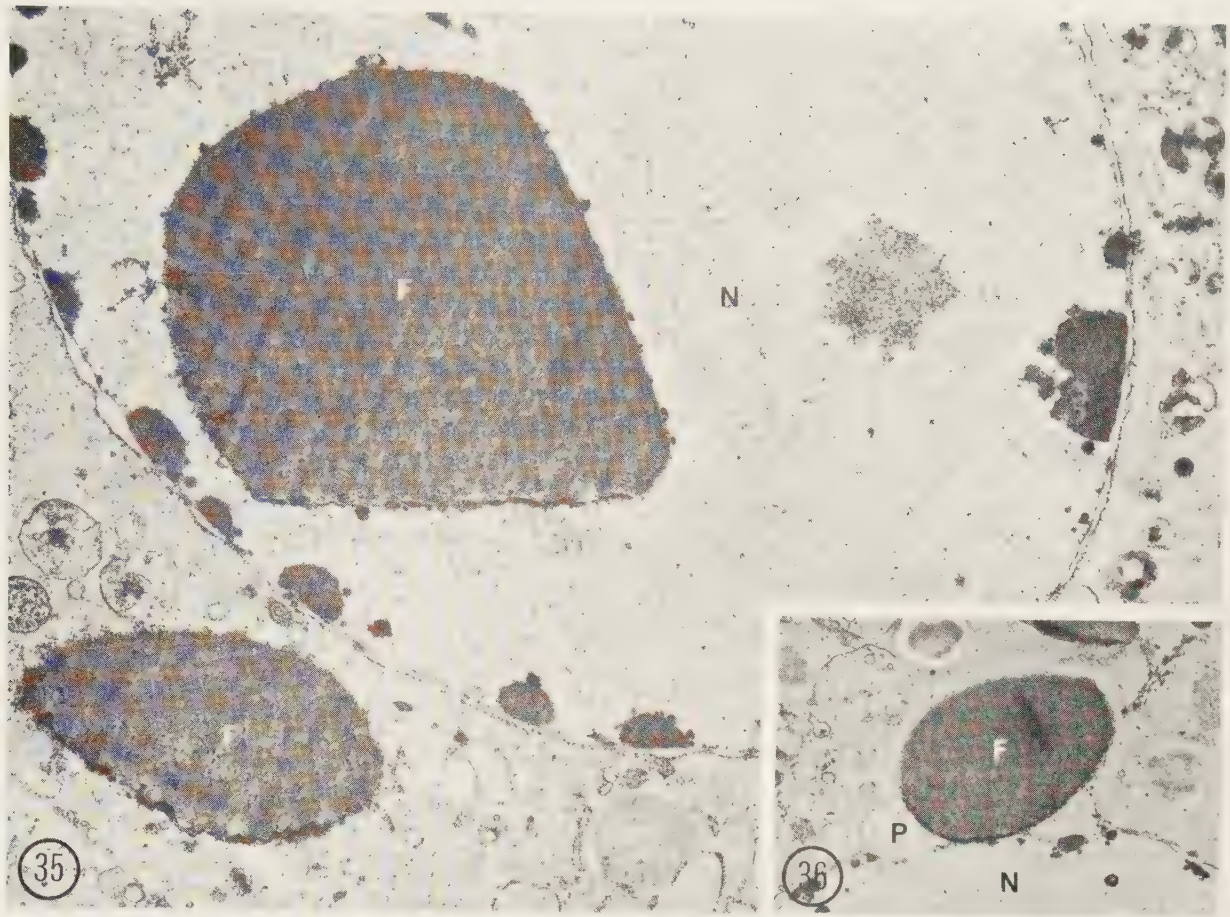
Morphogénèse des fuseaux.

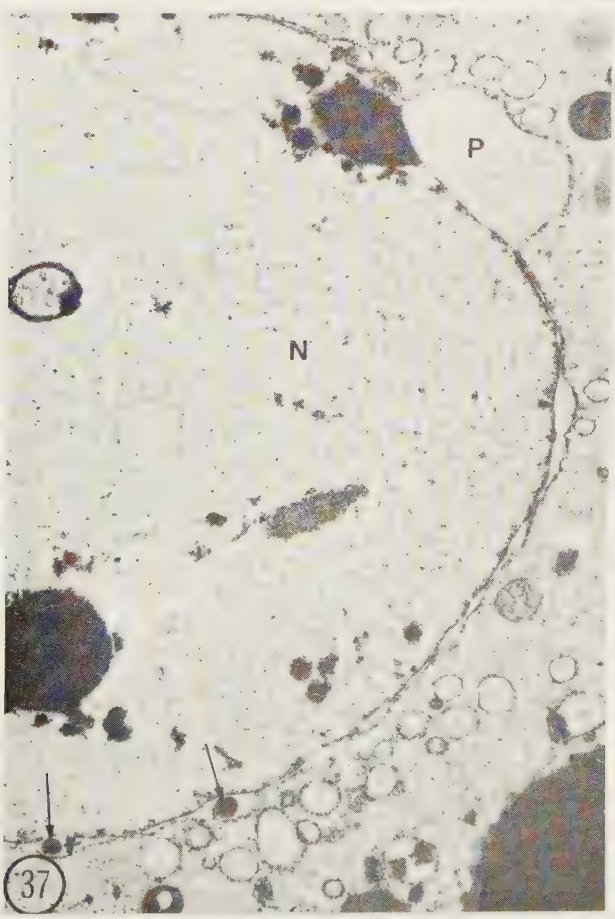
Fig. 35 : Fuseaux (F) situés à l'intérieur et à l'extérieur du noyau (N).
X 13.000

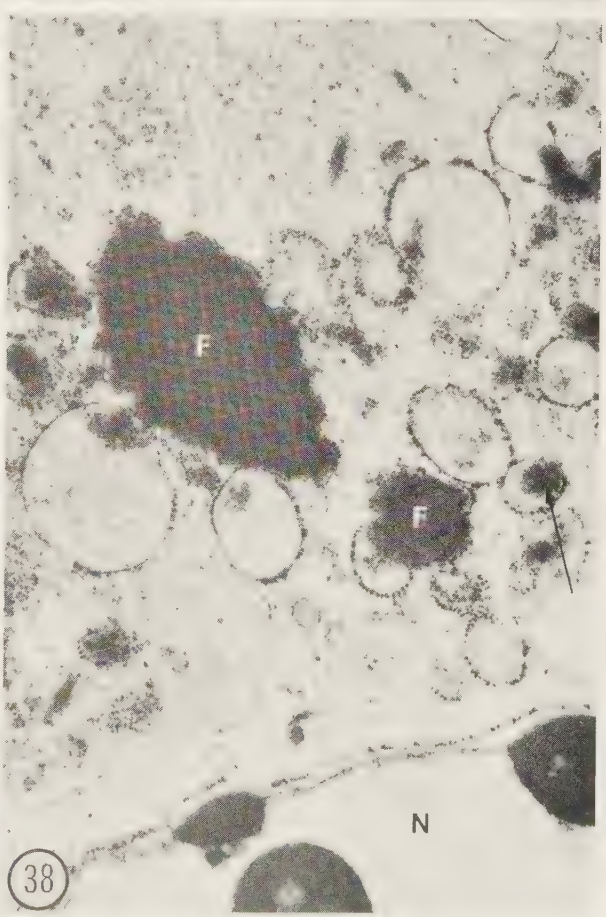
Fig. 36 : Fuseau (F) situé dans une poche (P) provenant de la délamination des membranes externe et interne d'un noyau (N).
X 9.000

Fig. 37 : Noyau d'une cellule fortement atteinte. L'espace situé entre la membrane externe et interne du noyau (N) est irrégulier, formant des poches (P). On reconnaît dans les espaces intermembranaires des amas de substance dense (flèches).
X 13.000

Fig. 38 : Citernes ergastoplasmiques à proximité d'un noyau (N) dont certaines renferment de petits fuseaux (F). La citerne indiquée par la flèche contient un matériel dense aux électrons semblable à celui accumulé entre les deux membranes du noyau sur la Figure 37.
X 26.000


F
N
F
35
F
P
N
36


P
N
37

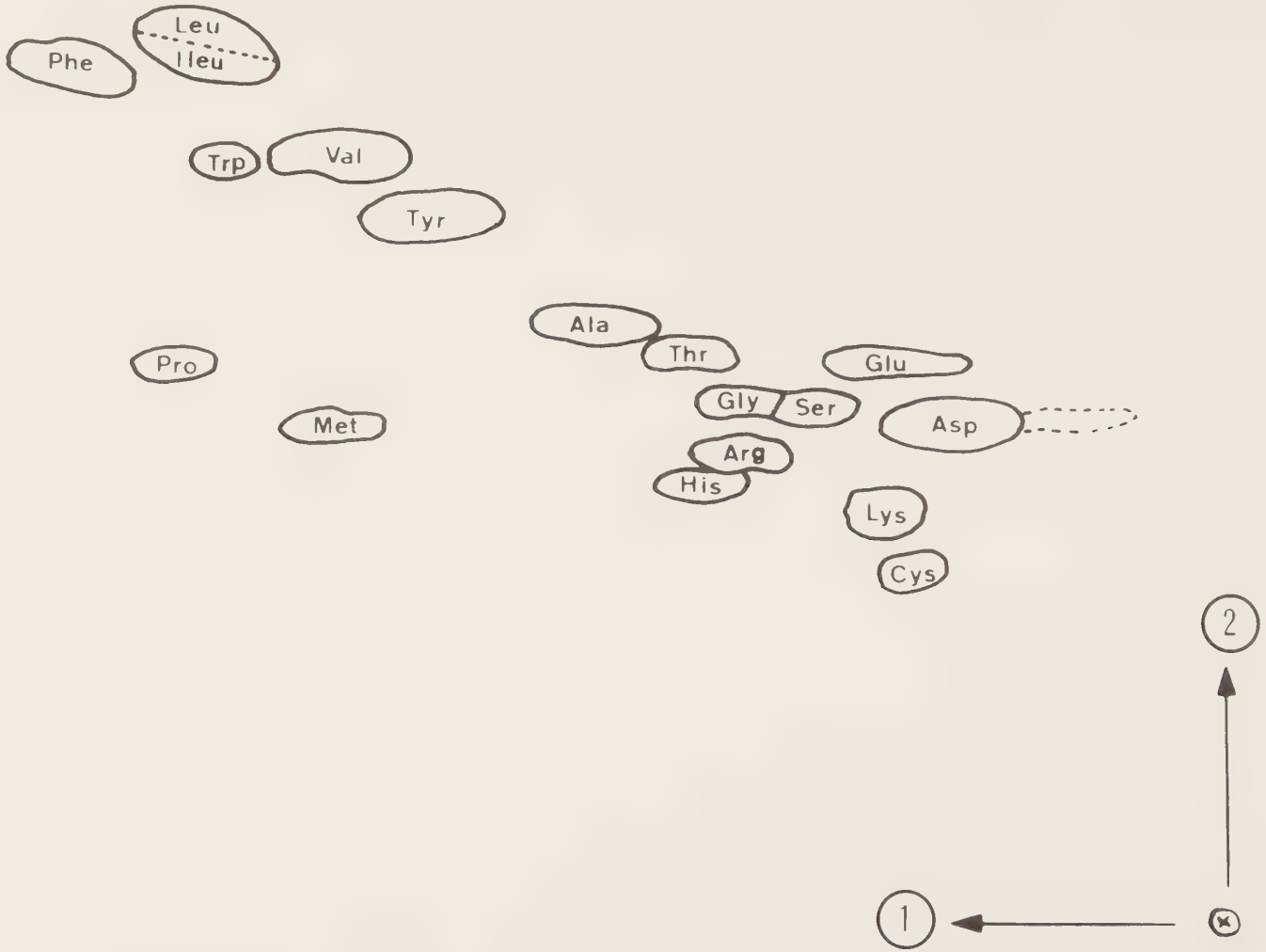

F
F
N
38

P L A N C H E XIII

Fig. 39 : Chromatogramme bidimensionnel en couche mince (cellulose-gel de silice) d'acides aminés obtenus par hydrolyse acide d'un mélange de fuseaux et de sphérules.

Première dimension (1) : phénol-eau, 4-1, p/v.

Deuxième dimension (2) : butanol-acide acétique-eau 5-1-4, v/v/v.

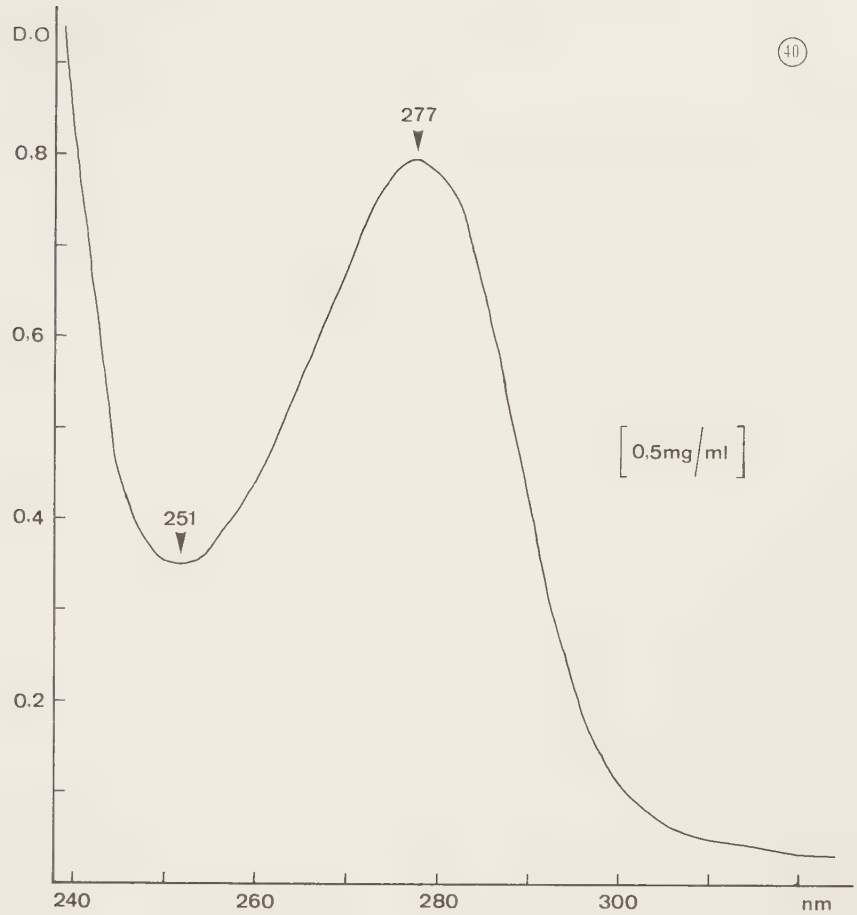

Leu
Ileu
Phe
Trp
Val
Tyr
Ala
Thr
Glu
Pro
Gly
Ser
Asp
Met
Arg
His
Lys
Cys
2
1

P L A N C H E XIV

Spectres comparés d'absorption dans l'ultra-violet
d'une solution de protéine(s) de sphérules
et d'une solution de sérum albumine bovine

Fig. 40 : Spectre d'absorption d'une solution de protéine(s) de sphérules dans le tampon glycine-soude 0,1 M à pH 8,86. Concentration : 0,5 mg/ml.

Fig. 41 : Spectre d'absorption d'une solution de sérum albumine dans le tampon glycine 0,1 M à pH 8,86. Concentration : 1 mg/ml. Bien que deux fois plus concentrée que la solution de protéine de sphérules (Fig. 40), cette solution a une densité optique plus faible.


D.O
0.8
0.6
0.4
0.2
277
251
[0.5mg/ml]
240
260
280
300
nm

(40)

D.O
0.8
0.6
0.4
0.2
277
251
[1 mg/ml]
240
260
280
300
nm

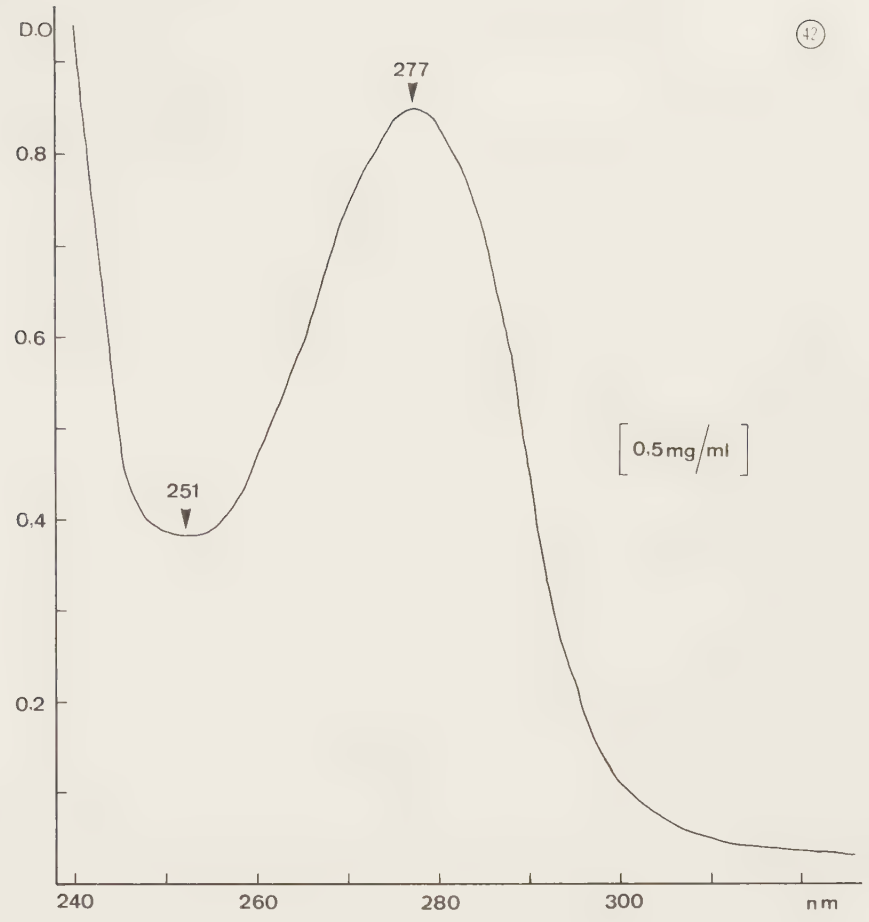
(41)

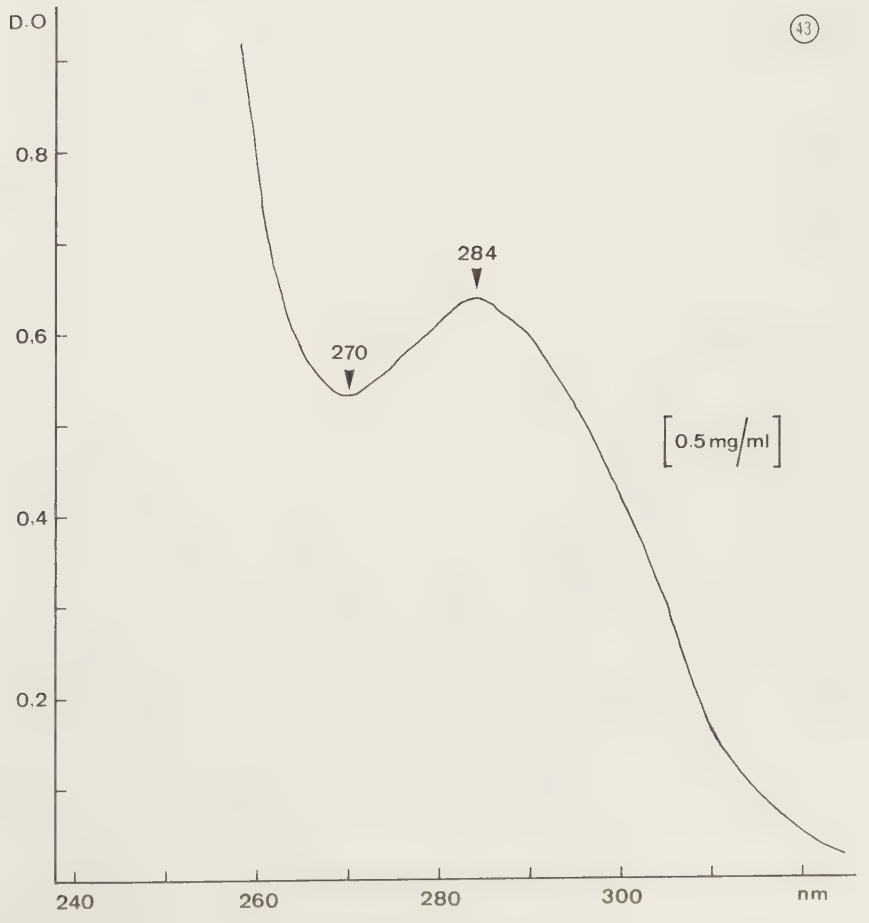
P L A N C H E XV

Influence du pH sur le spectre d'absorption en ultra-violet d'une solution de protéine(s) de fuseaux.

Fig. 42 : Spectre d'absorption d'une solution de protéine(s) de fuseaux dans le tampon glycine-soude 0,1 M à pH 8,86. Ce spectre est semblable à celui d'une solution de protéine(s) de sphérules présenté sur la Figure 40.

Fig. 43 : Spectre d'absorption d'une solution de protéine(s) de fuseaux dans la soude 0,01 M à pH 12,0. La dérive du maximum d'absorption vers des longueurs d'onde plus grandes (maximum à 284 nm) est due à la dissociation des résidus phénol de la tyrosine en anions phénolate, en milieu fortement alcalin ($pH \geqslant 10$).


42
D.O
0.8
0.6
0.4
0.2
277
251
[0.5mg/ml]
240
260
280
300
nm


43
D.O
0.8
0.6
0.4
0.2
284
270
[0.5mg/ml]
240
260
280
300
nm

P L A N C H E XVI

Ultrastructure des virions de l'entomopoxvirus de *Melolontha* purifiés par dissolution des sphérules. Morphologie des virions intacts et dégradés observés après coloration négative.

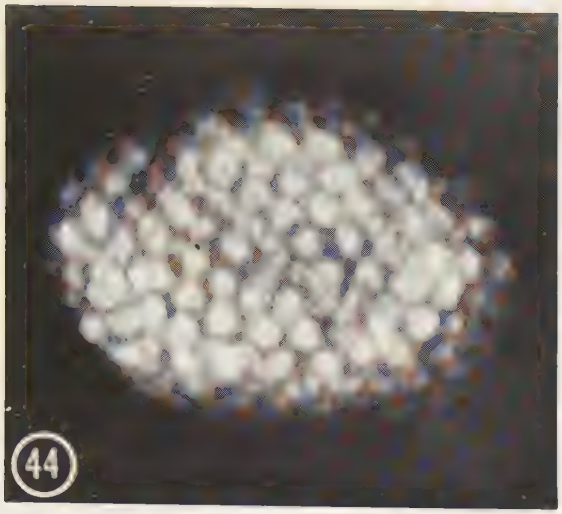
Fig. 44 : Virion non pénétré par l'acide phosphotungstique (APT). Des éléments globuleux d'environ 220 Å de diamètre disposés côte à côte ornent la surface du virion, lui donnant un aspect mûriforme caractéristique.
X 130.000

Fig. 45 : Virion pénétré par l'APT. La particule est gonflée et la pénétration du colorant révèle à l'intérieur de l'enveloppe (E) une structure en forme de sac, le nucléoïde (N), occupant une position centrale. Sur un côté de la particule, une substance amorphe, dense aux électrons, forme le corps latéral (CL).
X 110.000

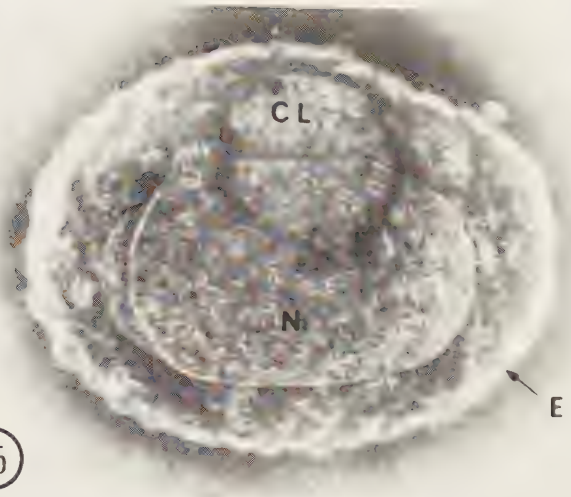
Fig. 46 : Virion endommagé par un contact prolongé avec la solution de thioglycolate utilisée pour dissoudre les sphérules. L'enveloppe (E) s'est déchirée, laissant échapper le nucléoïde (N). De petites projections radiales (flèches) recouvrent la surface du nucléoïde. CL : corps latéral.
X 110.000

Fig. 47 : Nucléoïde libre à la surface duquel s'observent de petites sous-unités tubulaires (flèches) d'environ 60 Å de diamètre.
X 132.000

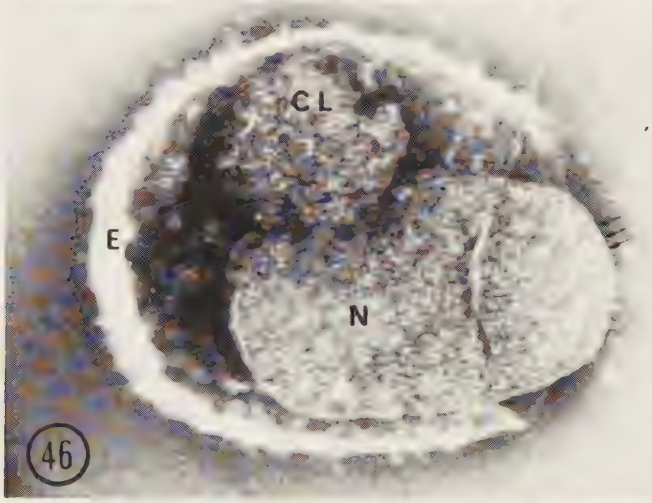
Fig. 48 à 50 : Enveloppes vides dont les éléments globuleux se sont affaissés (Fig. 50), ou semblent s'être dilatés sous l'action du thioglycolate, pour former des digitations (Fig. 48 et 49).
Fig. 48 et 49 : X 85.000 - Fig. 50 : X 110.000



44



45

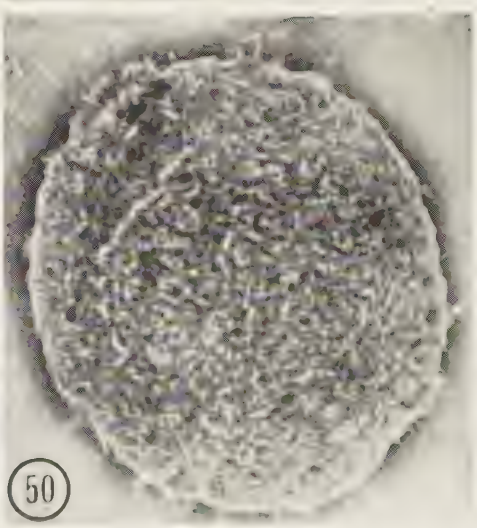


46

47

48

49

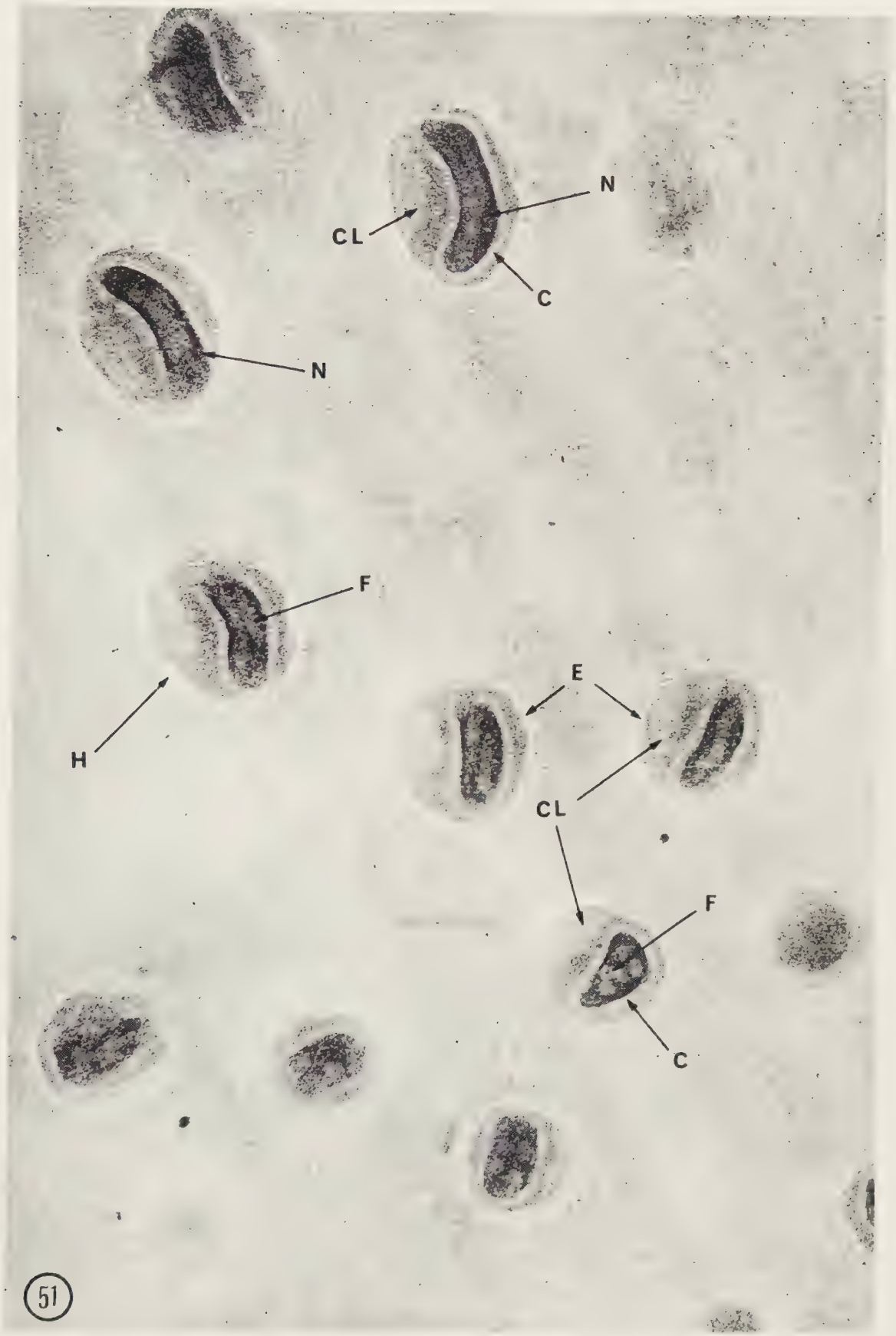


50

P L A N C H E XVII

Ultrastructure des virions de l'entomopoxvirus de *Melolontha*. Structure des virions inclus dans les sphérules.

Fig. 51 : Coupe ultra-fine d'une sphérule montrant des virions sectionnés selon leur grand axe (haut de la figure) ou transversalement (bas de la figure). Les trois constituants essentiels du virion s'observent clairement : l'enveloppe festonnée (E), le corps latéral (CL) et le nucléoïde (N) réniforme en section longitudinale. Ce dernier est délimité par une coque (C) et renferme une structure filamenteuse (F) d'opacité aux électrons plus faible que la substance fondamentale du nucléoïde. Un hâlo clair (H) sépare l'enveloppe des virions de la trame cristalline de l'inclusion.
X 76.000

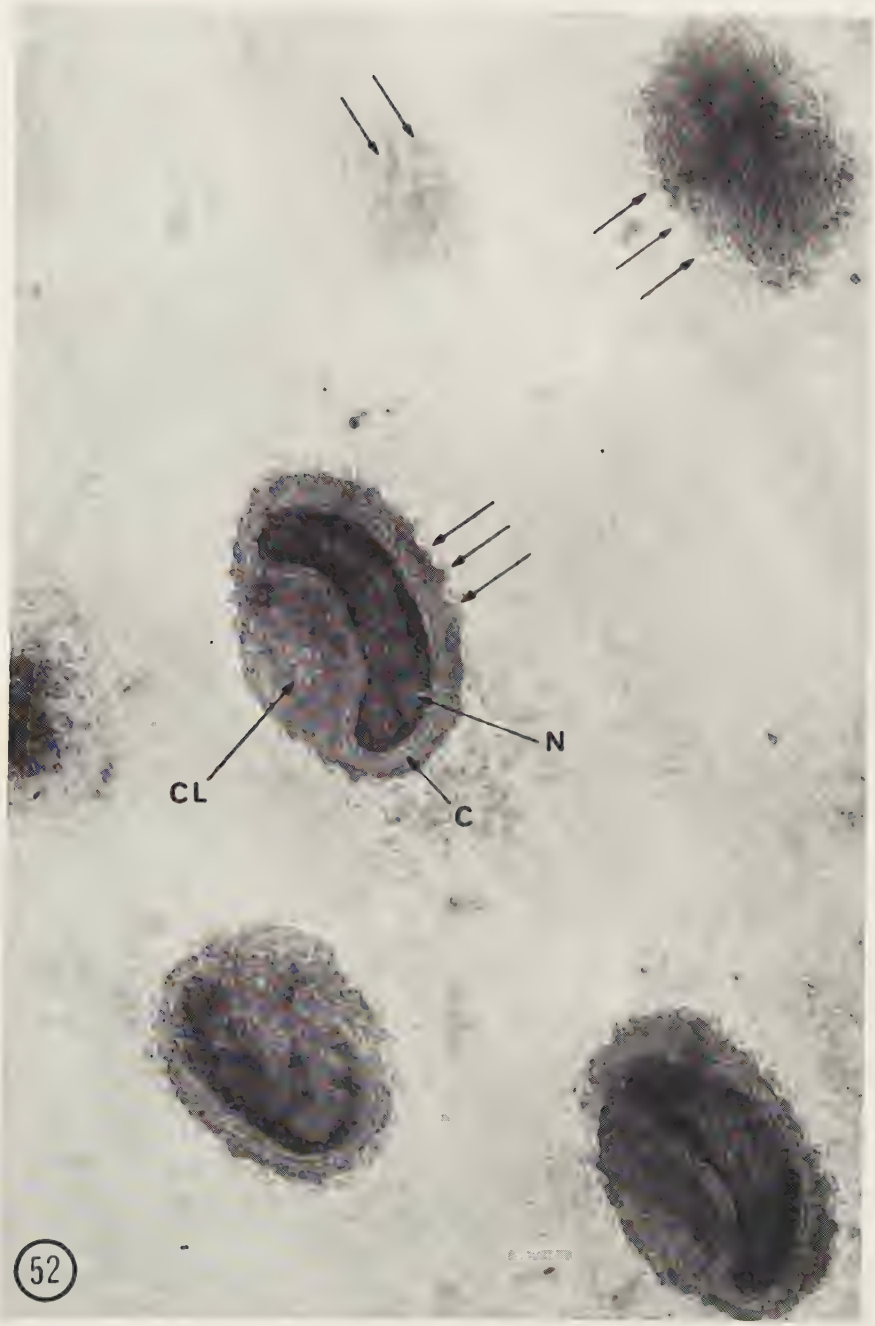


51

P L A N C H E XVIII

Ultrastructure des virions de l'entomopoxvirus de *Melolontha*. Structure des virions inclus dans les sphérules.

Fig. 52 : Coupe ultra-fine dans une sphérule montrant les détails de la surface des virions. Les éléments globuleux de l'enveloppe (flèches) donnent aux virions coupés tangentiellement l'aspect caractéristique de mûres (comparer avec la Figure 44, Pl. XVI).
CL : corps latéral.
C : coque à 3 feuillets de 150 Å d'épaisseur totale.
N : nucléoïde.
X 140.000



52

P L A N C H E XIX

Ultrastructure du virion de l'entomopoxvirus de *Melolontha*.
Structure des virions inclus dans les sphérules et
libres dans le cytoplasme.

Fig. 53 à 57 : Quelques aspects des virions selon le plan de coupe et le mode de fixation et d'inclusion.

Fig. 53 : Fixation à l'acide osmique seul et inclusion dans l'épon. Sur cette coupe longitudinale d'un virion, le hâlo est à peine visible. La structure filamenteuse (f) à l'intérieur du nucléoïde apparaît comme un filament unique formant un S.
X 140.000

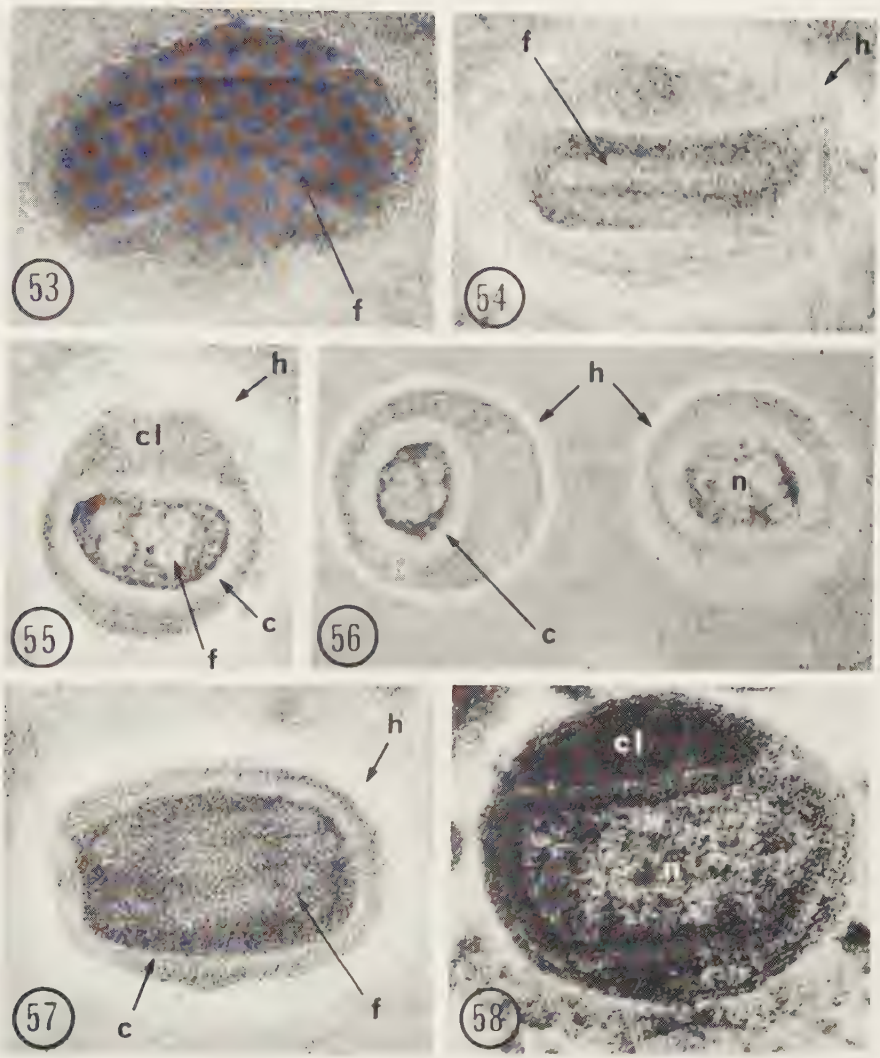
Fig. 54 : Double fixation glutaraldéhyde-acide osmique et inclusion dans l'épon. Coupe longitudinale d'un virion. Le hâlo clair (h) entourant le virion est bien visible. Comme sur la figure précédente, la structure filamenteuse (f) semble repliée sur elle-même.
X 135.000

Fig. 55 : Même type de fixation et d'inclusion que sur la Figure 54. Coupe transversale d'un virion. Le hâlo clair (h) est également bien développé. Les sections transversales de la structure filamenteuse (f) apparaissent comme des masses circulaires claires avec un canal central dense aux électrons. cl : corps latéral ; c : coque du nucléoïde.
X 120.000

Fig. 56 : Fixation glutaraldéhyle seul et inclusion en GMA. Dans ces deux sections transversales de virions, le hâlo est très régulier et relativement mince par rapport à celui entourant le virion de la figure précédente.
X 120.000

Fig. 57 : Même type de fixation et d'inclusion que sur la Figure 54. Coupe horizontale (section selon le grand axe du virion, dans un plan perpendiculaire à celui de la Figure 54). Dans ce plan, le corps latéral n'est plus visible et la coque du nucléoïde (c) suit régulièrement le contour de l'enveloppe. f : structure filamenteuse ; h : hâlo à la périphérie du virion.
X 134.000

Fig. 58 : Coupe longitudinale d'un virion libre dans le cytoplasme d'une cellule adipeuse. L'architecture du virion est la même que sur les figures précédentes mais le nucléoïde (n) présente une texture fibreuse dans laquelle on n'observe pas de structure filamenteuse. cl : corps latéral.
X 110.000


53
f
54
f
h
55
h
cl
c
f
56
h
n
c
57
h
c
f
58
cl

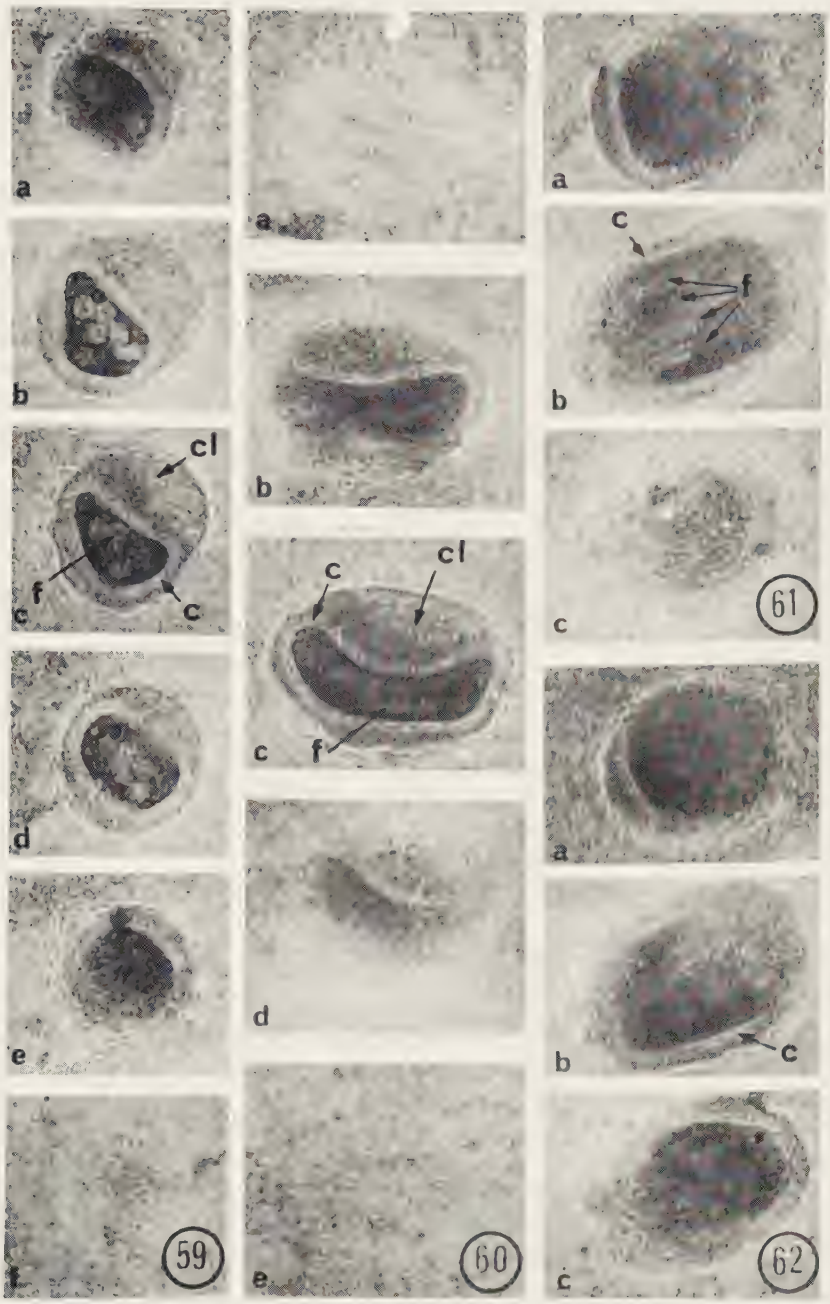
P L A N C H E XX

Ultrastructure des virions de l'entomopoxvirus de *Melolontha*. Coupes sériées de virions dans différents plans.

Fig. 59 : Coupes sériées d'un virion dans le plan transversal. Le virion a un contour à peu près circulaire dans ce plan. La section de la figure c passe approximativement par le plan de symétrie transversale du virion. A ce niveau, le corps latéral (cl) a son épaisseur maximum. A l'intérieur du nucléoïde, on distingue 5 sections circulaires de la structure filamenteuse (f).
c : coque du nucléoïde.
X 80.000

Fig. 60 : Coupes sériées d'un virion dans le plan longitudinal. Le contour du virion est de forme ovale dans ce plan. Au niveau de la figure c, la section passe à peu près exactement par le plan de symétrie longitudinale. cl : corps latéral ; c : coque du nucléoïde ; f : structure filamenteuse.
X 80.000

Fig. 61 et 62 : Coupes sériées de 2 virions dans le plan horizontal (perpendidulaire au plan de symétrie longitudinale). Les virions ont une forme rectangulaire dans ce plan. Le corps latéral n'est plus visible et la coque du nucléoïde (c) suit régulièrement le contour du virion. f : structure filamenteuse.
X 80.000


a
b
cl
f
c
d
e
59
a
b
c
cl
f
d
e
60
a
c
f
b
c
61
a
b
c
62

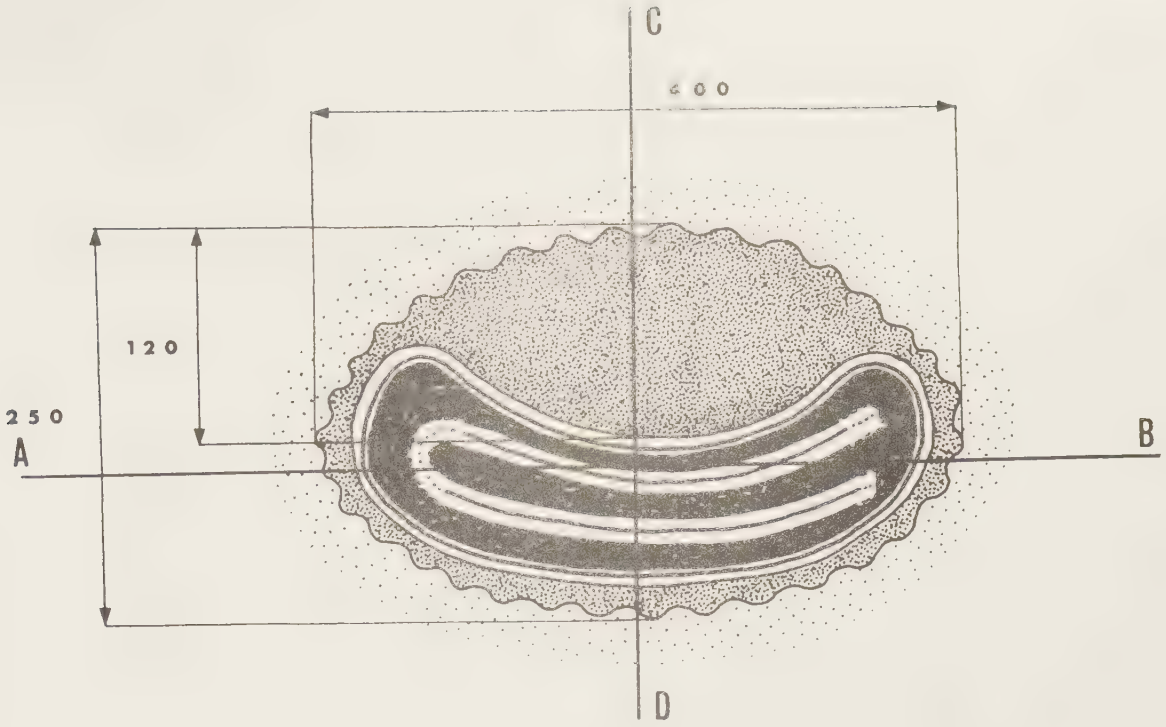
P L A N C H E XXI

Représentation schématique du virion de l'entomopoxvirus de *Melolontha*. Les dimensions sont indiquées en nm et représentent des valeurs moyennes.

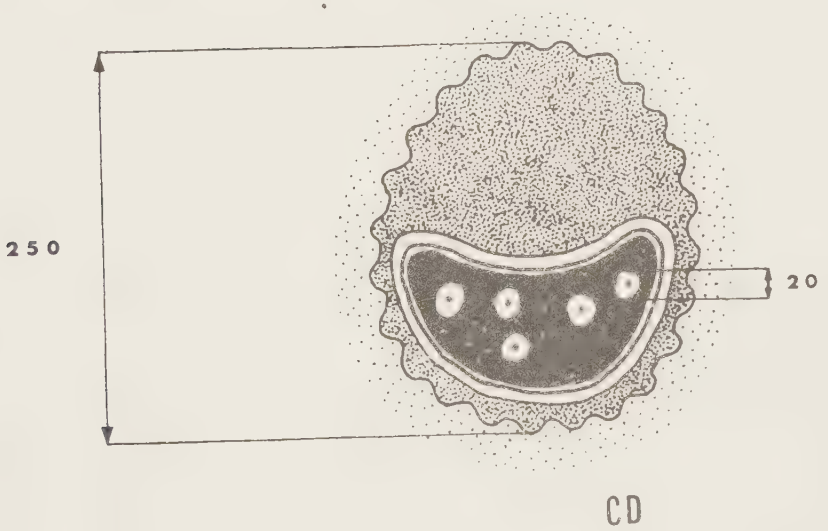
Fig. 63 : a) coupe passant par le plan de symétrie longitudinale.

b) coupe passant par le plan de symétrie transversale (axe CD).

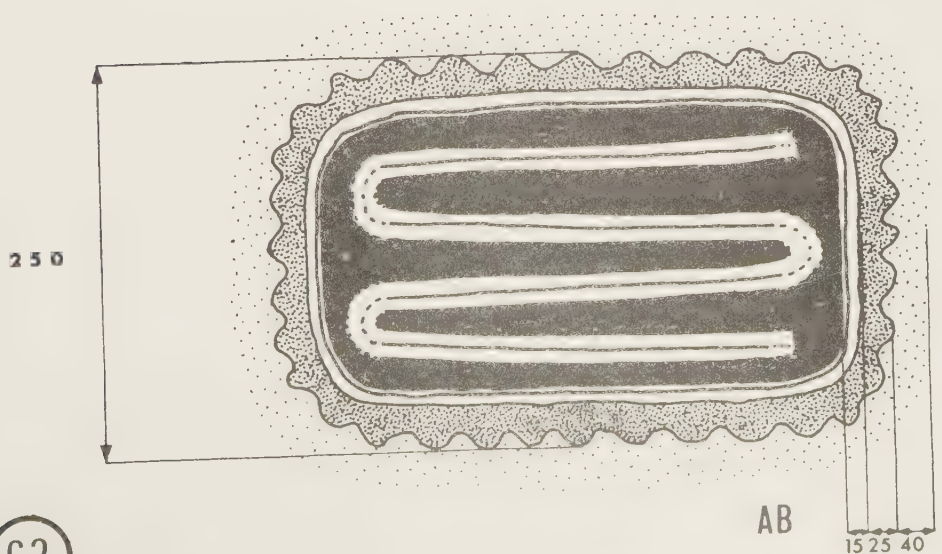
c) coupe passant par le plan horizontal, selon l'axe AB.



a



b



c

P L A N C H E XXII

Etude cytochimique des virions
de l'entomopoxvirus de *Melolontha*.

Fig. 64 : Mise en évidence de l'ADN sur coupe en GMA, selon la technique de BERNHARD (1969). La forte imprégnation de la substance fondamentale du nucléoïde par les sels d'urane indique la localisation de l'ADN viral dans cette partie du virion. La structure filamenteuse apparaît peu colorée.
X 95.000

Fig. 65 : Mise en évidence de l'ADN sur coupes en épon, selon la technique de CHARRET (1969). Comme dans la figure précédente, la substance fondamentale du nucléoïde est fortement colorée tandis que les sections de la structure filamenteuse sont faiblement contrastées.
X 102.000

Fig. 66 : Digestion par la DNase 0,1 % pendant 1 heure sur coupe en GMA : les particules présentent un centre creux correspondant à la digestion du matériel contenu dans le nucléoïde.
X 70.000

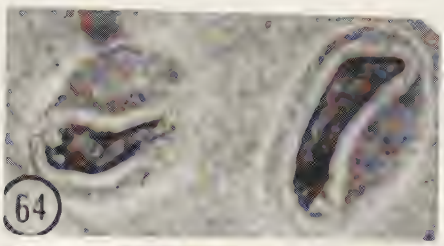
Fig. 67 : Coupe traitée comme précédemment mais sans DNase. Le nucléoïde est intensément coloré par l'acétate d'urane.
X 70.000

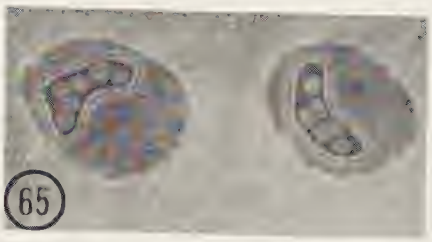
Fig. 68 : Mise en évidence de glycoprotéines selon la technique de RAMBOURG (1967), sur coupes en GMA. Le hâlo entourant les virions ainsi que le contenu du nucléoïde sont nettement colorés par cette réaction.
X 52.000

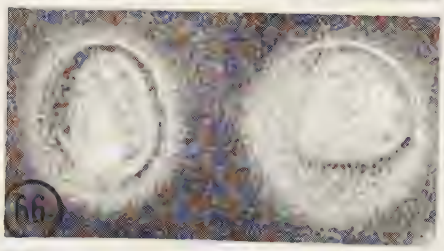
Fig. 69 : Coloration des glycoprotéines selon la même technique que précédemment mais après une digestion préalable à la DNase. L'intérieur du nucléoïde est fortement coloré par cette réaction.
X 84.000

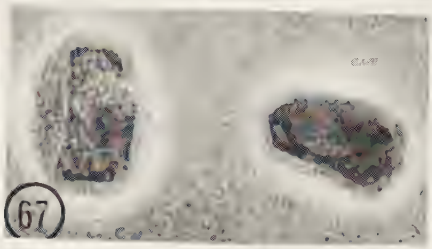
Fig. 70 : Digestion par la pepsine à 0,01 % pendant 30 minutes sur coupes en épon. La substance entourant le nucléoïde est partiellement digérée.
X 80.000

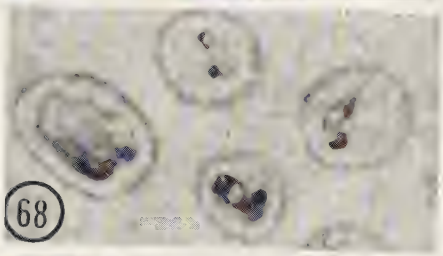
Fig. 71 : Digestion par la pepsine à 0,1 % pendant 1 heure sur coupes en épon. Les virions sont complètement digérés, laissant des trous dans l'inclusion. La protéine cristallisée de la sphérule n'est apparemment pas attaquée par ce traitement.
X 49.000

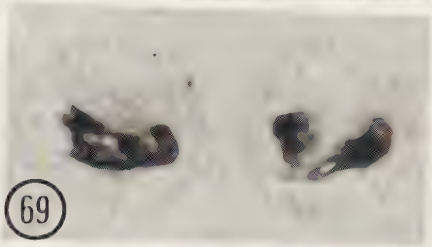

64


65

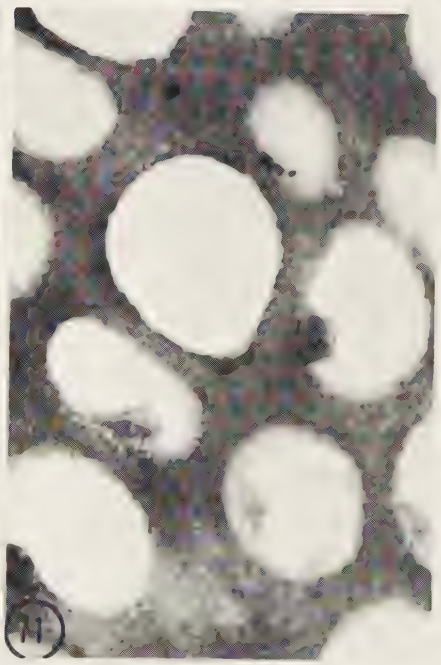

66


67


68


69

70


71

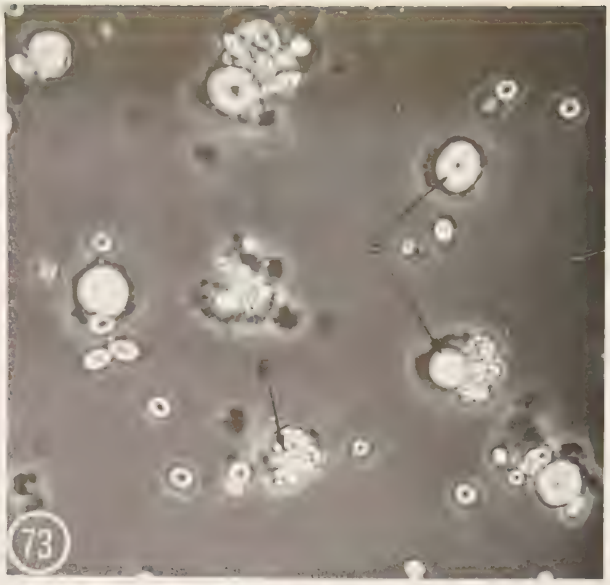
P L A N C H E XXIII

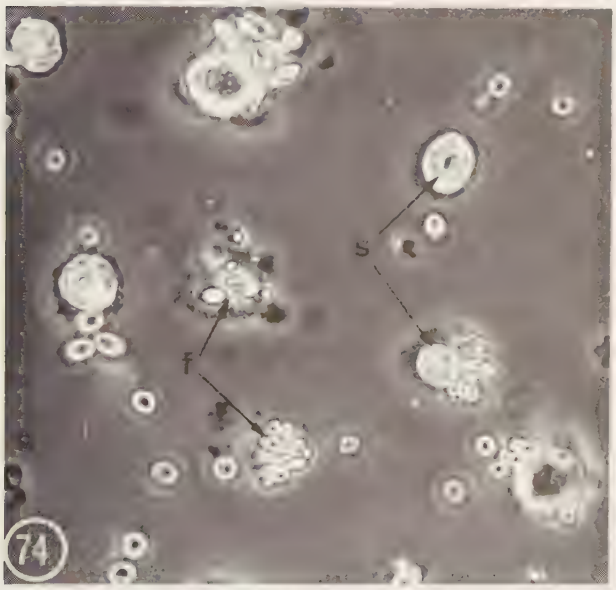
Fig. 72 à 77 : Stades successifs de la dissolution des fuseaux et des sphérules de l'entomopoxvirus de *Melolontha* dans une solution de thioglycolate 0,125 M, tanponnée à pH 10,25. Observations au microscope photonique en contraste de phase.

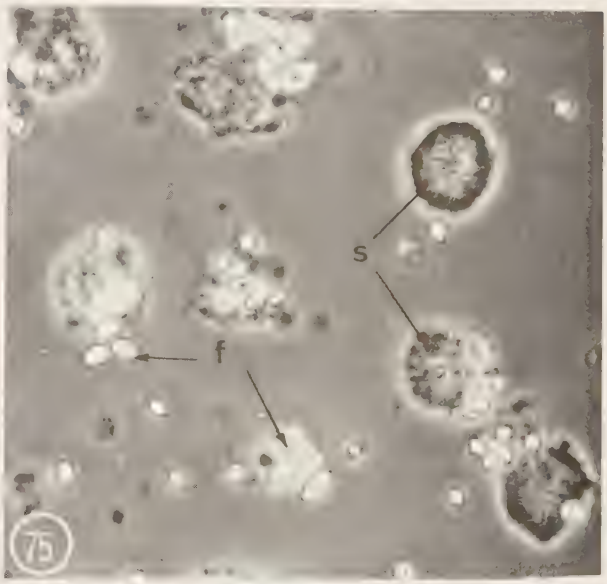
- Sphérules (s) et fuseaux (f) intacts (Fig. 72).
- Début de gonflement des sphérules (Fig. 73).
- Apparition de granulations dans les sphérules (Fig. 74).
- Perte de réfringence des sphérules (Fig. 75).
- Eclatement des sphérules dont le contenu se déverse dans le milieu extérieur (Fig. 76).
- Fin de la dissolution des sphérules et fissuration des fuseaux (Fig. 77).

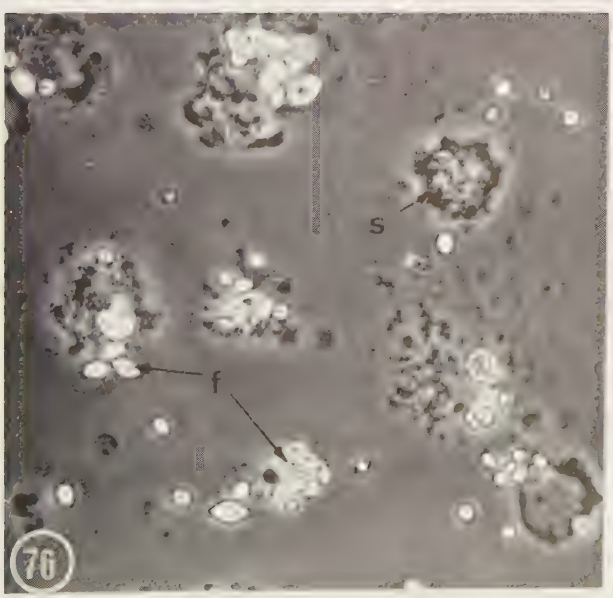
X 600

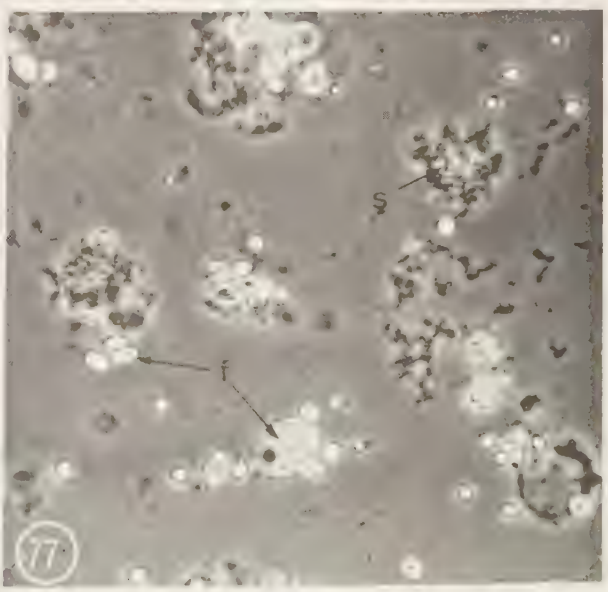
f
s
f
72


s
f
73


s
f
74


s
f
75


s
f
76

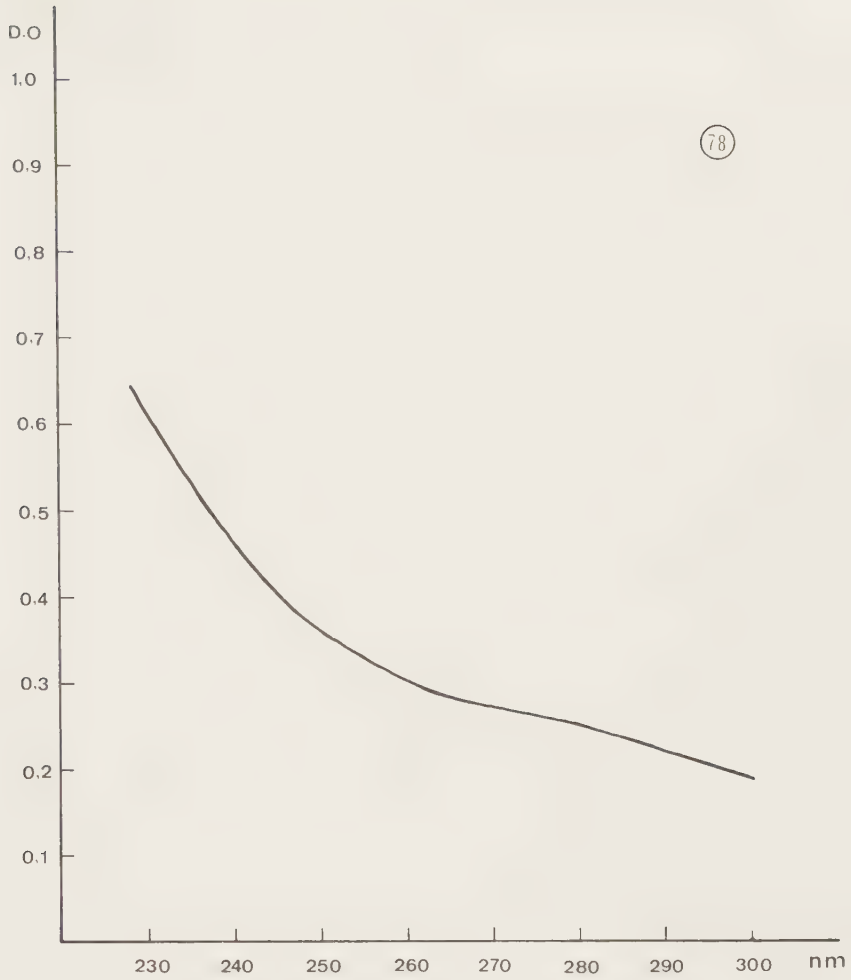

s
f
77

P L A N C H E XXIV

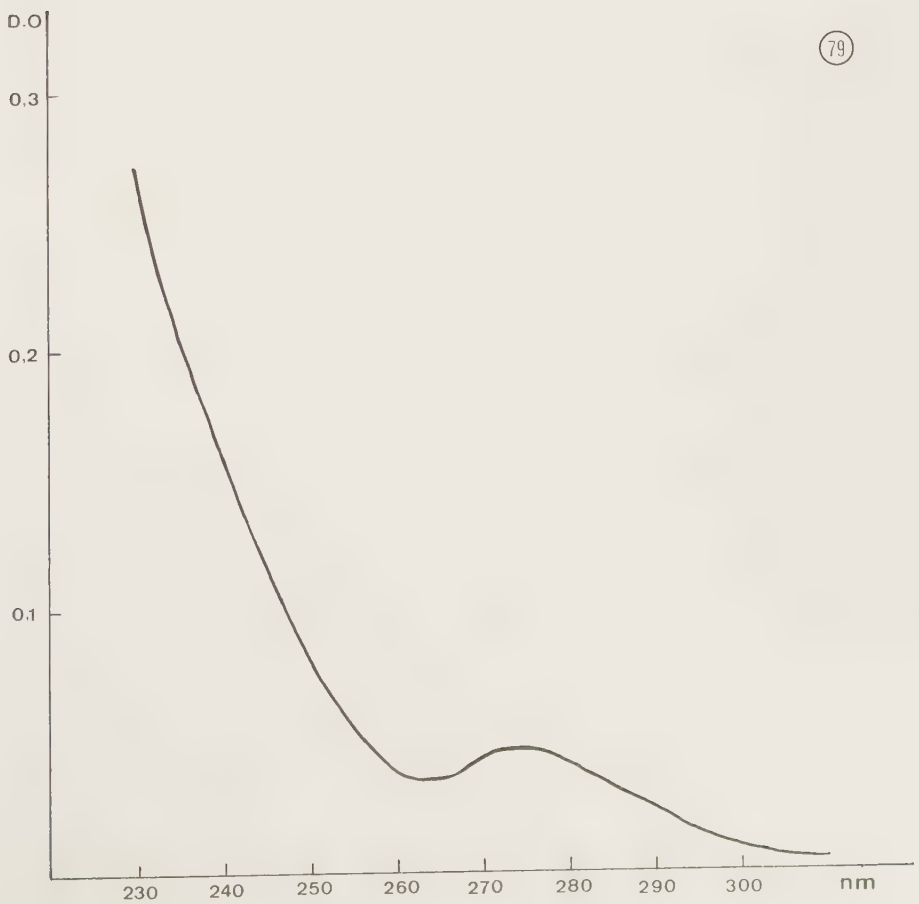
Spectre d'absorption dans l'ultra - violet
d ' une suspension purifiée de virions
de l'entomopoxvirus de *Melolontha*

Fig. 78 : Spectre enregistré. Du fait de leur grande taille, les virions en suspension diffractent la quasi totalité de la lumière qui les traverse, masquant ainsi l'absorption spécifique de la nucléoprotéine virale. Aucun maximum n'est visible, on note seulement un épaulement entre 280 et 260 nm.

Fig. 79 : Spectre corrigé pour la diffraction de la lumière en appliquant la méthode de BONHOEFFER et SCHACHMAN (1960) (voir p. 61). Le maximum d'absorption se situe vers 275 nm et le rapport DO_{260}/DO_{280} est de 0,95.


D.O
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
230
240
250
260
270
280
290
300
nm

78


D.O
0.3
0.2
0.1
230
240
250
260
270
280
290
300
nm

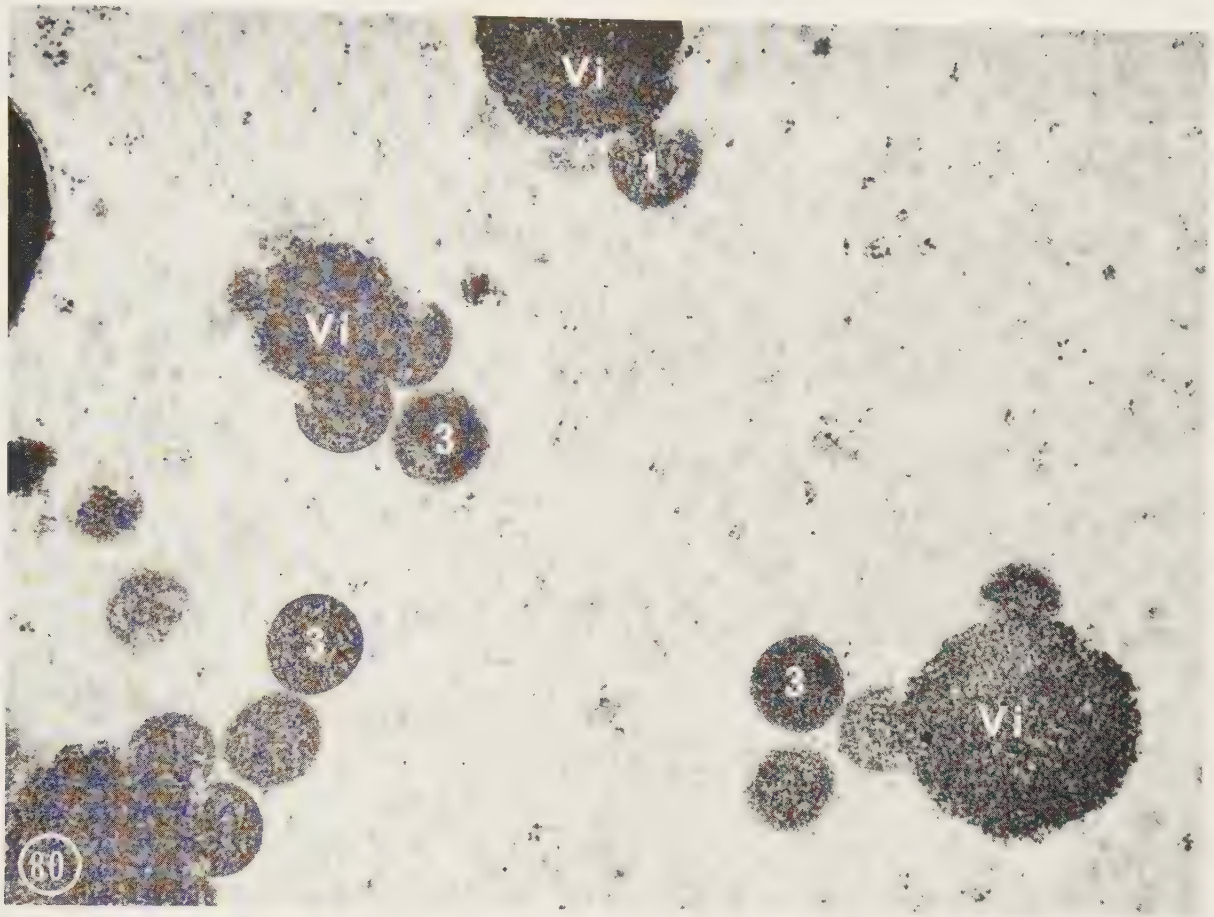
79

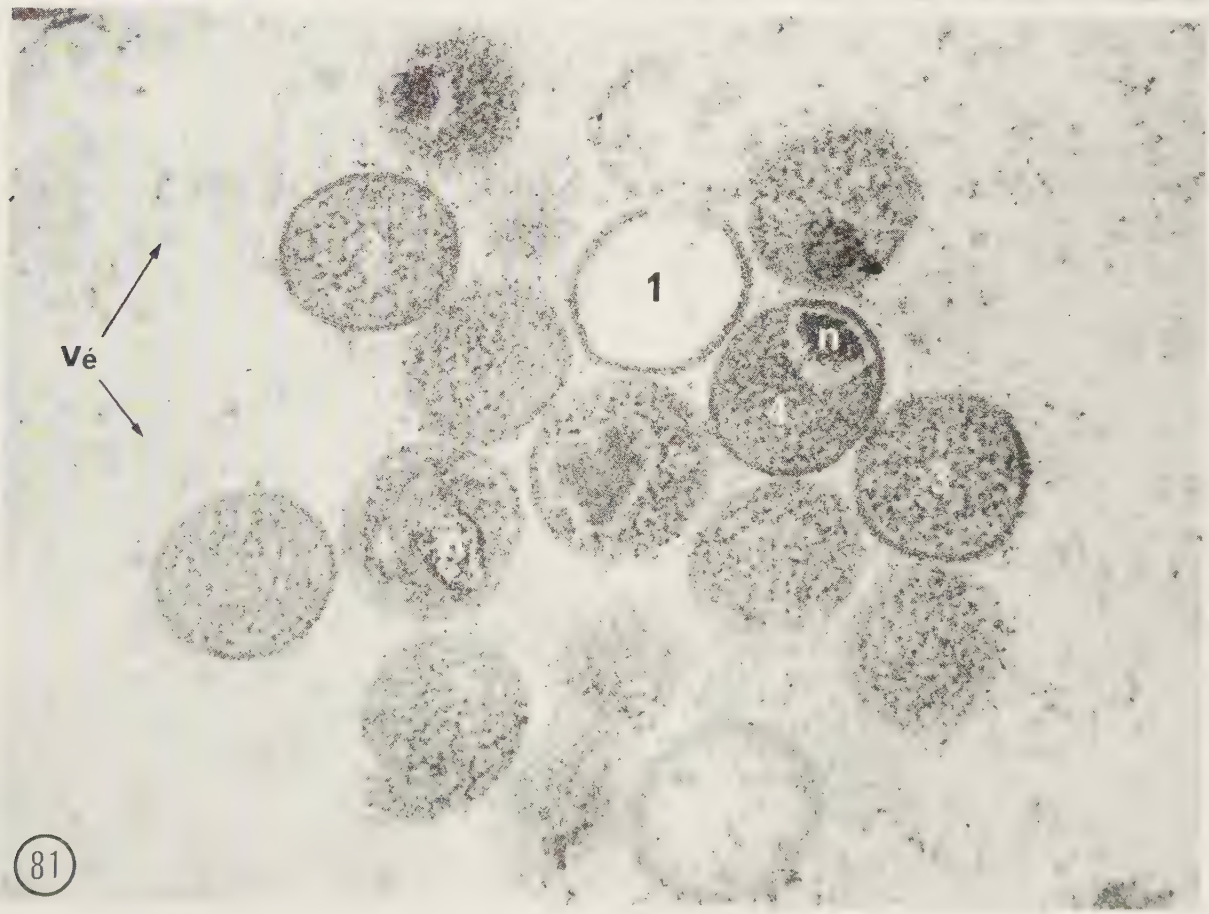
P L A N C H E XXV

Morphogénèse de l'entomopoxvirus de *Melolontha* dans les cellules du tissu adipeux de son hôte.

Fig. 80 : Formation des particules immatures à partir des viroplasmes (vi). Des enveloppes membranaires en arc de cercle (particules de type 1) s'élaborent à la périphérie des viroplasmes dont elles encerclent progressivement la substance granulaire. En se refermant sur elles-mêmes, les cupules délimitent des particules sphériques de 450-500 nm de diamètre, de forte opacité aux électrons (particules de type 3).
X 32.000

Fig. 81 : Formation de particules immatures dans une plage cytoplasmique présentant une faible opacité aux électrons. On reconnaît dans ce champ différentes formes immatures : des formes en cupules claires aux électrons (particules de type 1) ; des particules sphériques denses contenant un matériel granulaire homogène (particules de type 3) ; des particules sphériques denses dans lesquelles un noyau de densification excentrique (n) est apparu (particules de type 4). De nombreuses vésicules (Vé) s'observent dans le cytoplasme environnant.
X 52.000


Vi
1
Vi
3
3
3
Vi
80


Vé
1
n
81

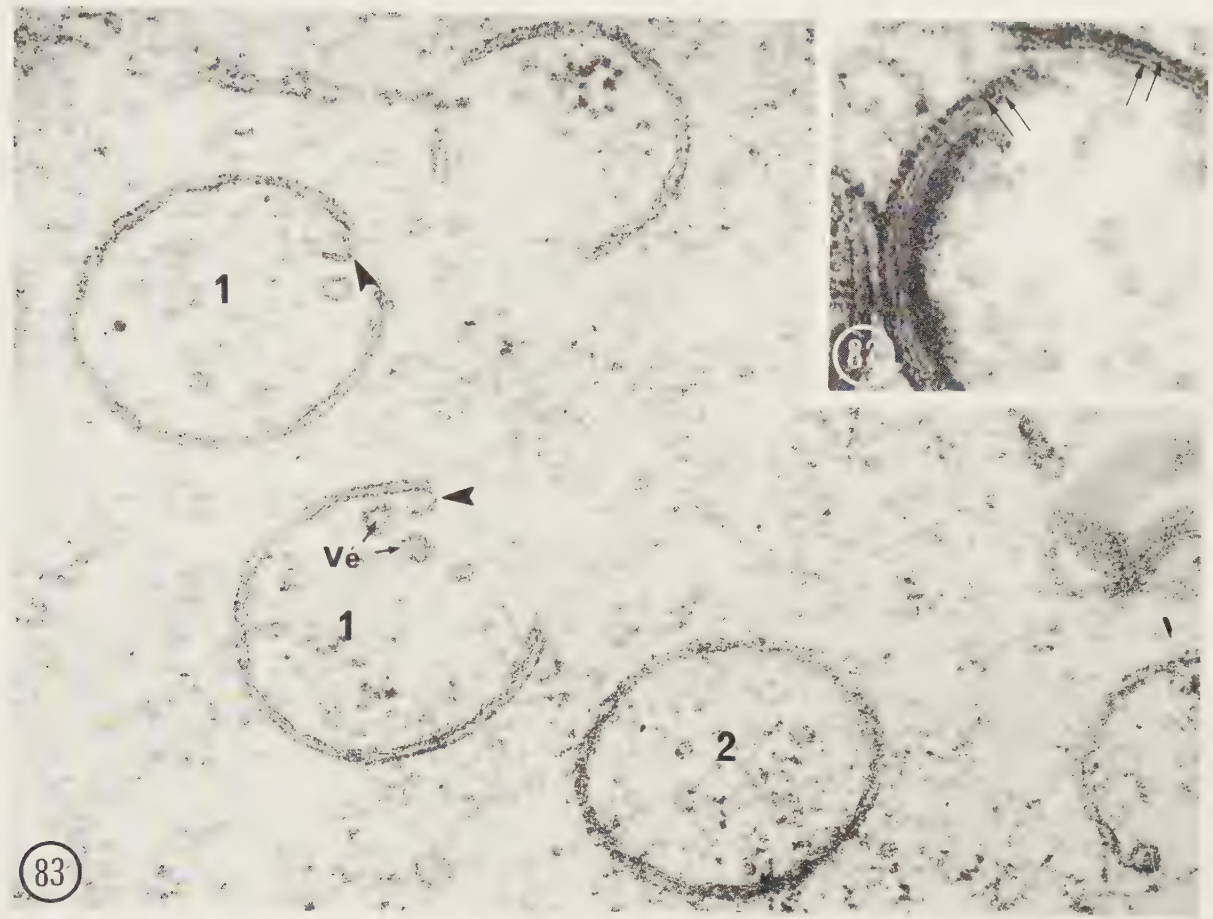
P L A N C H E XXVI

Morphogénèse de l ' entomopoxvirus de *Melolontha* dans les cellules du tissu adipeux de son hôte.

Fig. 82 : Détail de la structure de l'enveloppe des formes immatures. Celle-ci est constituée d'une membrane unitaire interne (flèches) d'environ 75 Å d'épaisseur, recouverte par une membrane externe indifférenciée de même épaisseur.
X 190.000

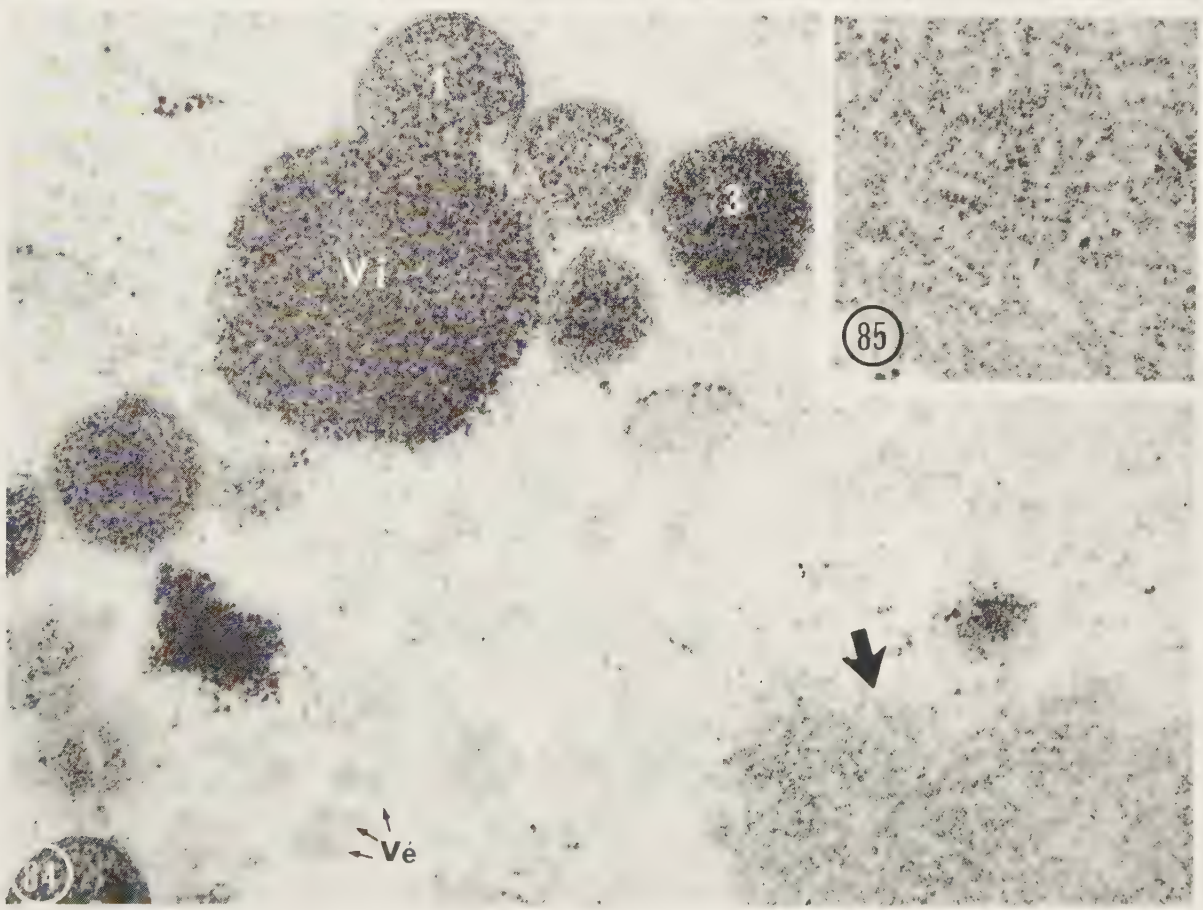
Fig. 83 : Détail de la formation des cupules dans une plage cytoplasmique claire aux électrons. Des éléments vésiculaires (Vé) s'observent à l'intérieur des cupules (particules de type 1) ou en continuité avec la membrane unitaire interne (flèches). La particule sphérique claire aux électrons (particule de type 2) renferme également des éléments vésiculaires.
X 83.000

Fig. 84 et 85 : A côté des masses viroplasmiques (Vi) on observe dans les aires de virogénèse des amas de substance ayant une densité moyenne aux électrons (flèche). A fort grossissement, ils apparaissent constitués de bâtonnets cylindriques d'environ 150 Å de diamètre. La présence de profils circulaires suggère qu'il s'agirait de cylindres creux.
Fig. 84 : X 52.000
Fig. 85 : X 90.000



83

84



85

P L A N C H E XXVII

Séquence possible des principales étapes de la morphogénèse de l'entomopoxvirus de *Melolontha* dans les cellules adipeuses de son hôte.

(Voir également Fig. 183, Pl. LIX).

Fig. 86 : Elaboration de l'enveloppe (particule de type 1) avec participation probable des éléments vésiculaires (flèches) dans la formation de la membrane unitaire interne.
X 115.000

Fig. 87 : Particule sphérique de faible opacité aux électrons (particule de type 2). Ces particules évolueraient en particules sphériques denses (figure suivante), par condensation de matériel à l'intérieur de l'enveloppe ou, plus vraisemblablement, par remplissage avec du matériel externe pénétrant par des ouvertures dans la sphère.
X 115.000

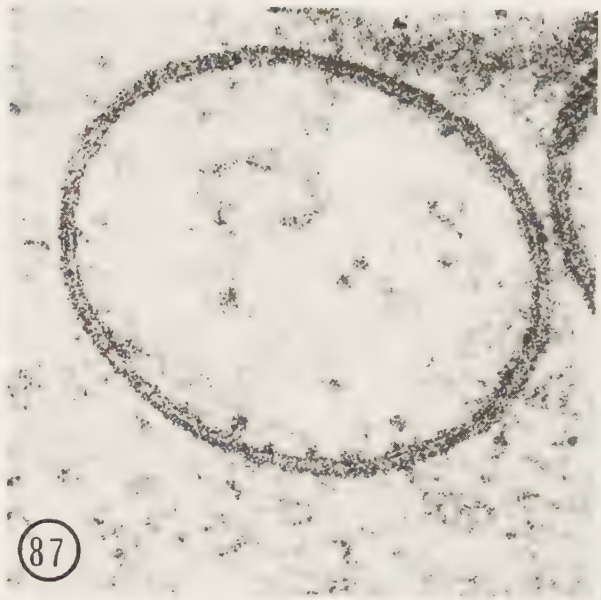
Fig. 88 : Particule sphérique renfermant un matériel granulaire dense (particule de type 3). Ces particules se forment directement au contact des viroplasmes ou par remplissage de particules claires aux électrons (figure précédente).
X 115.000

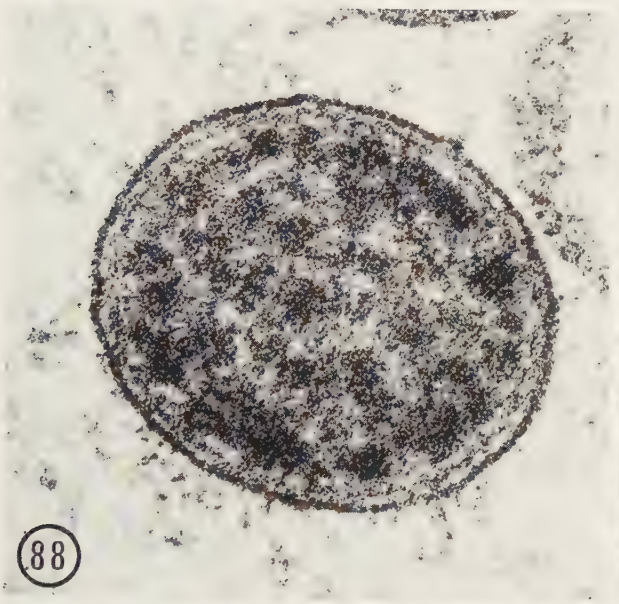
Fig. 89 : Un noyau de densification excentrique (n) apparaît dans la particule (particule de type 4) à partir duquel le nucléoïde semble s'organiser.
X 115.000

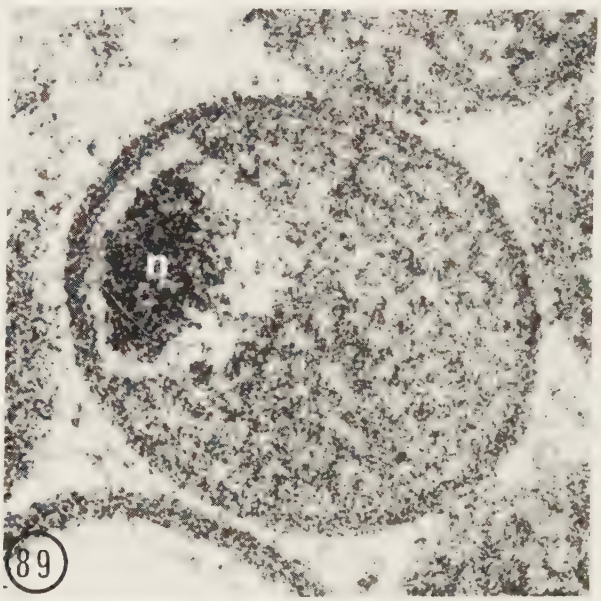
Fig. 90 : Particule sphérique dans laquelle la coque (flèche) du nucléoïde (n) est déjà différenciée. Cette étape, probablement fugace, s'observe rarement.
X 100.000

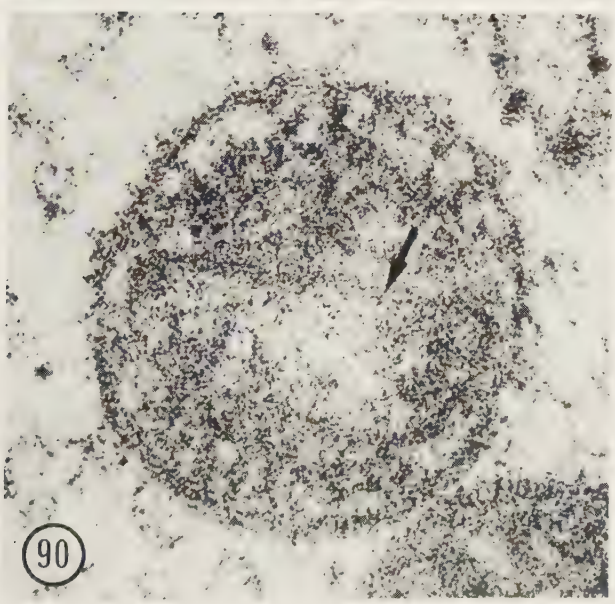
Fig. 91 : Particule allongée dont le nucléoïde (n) possède une structure fibrillaire et une coque (flèche) bien différenciée. La substance entre l'enveloppe et la coque du nucléoïde est partiellement condensée (particule de type 5).
X 100.000

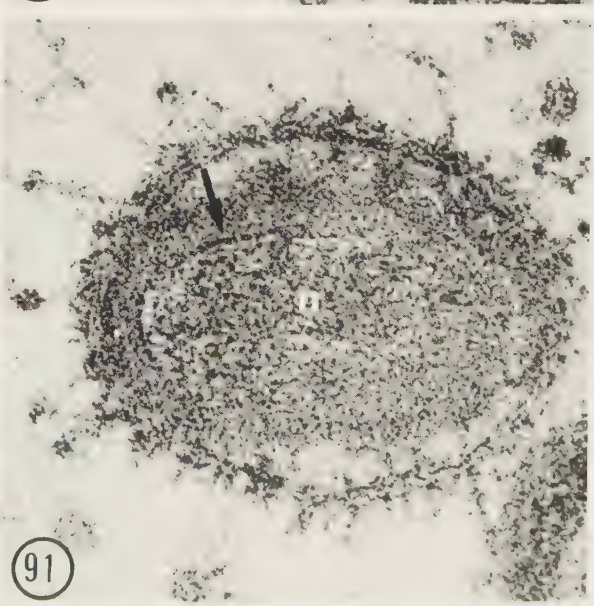
86


87


88


89


90

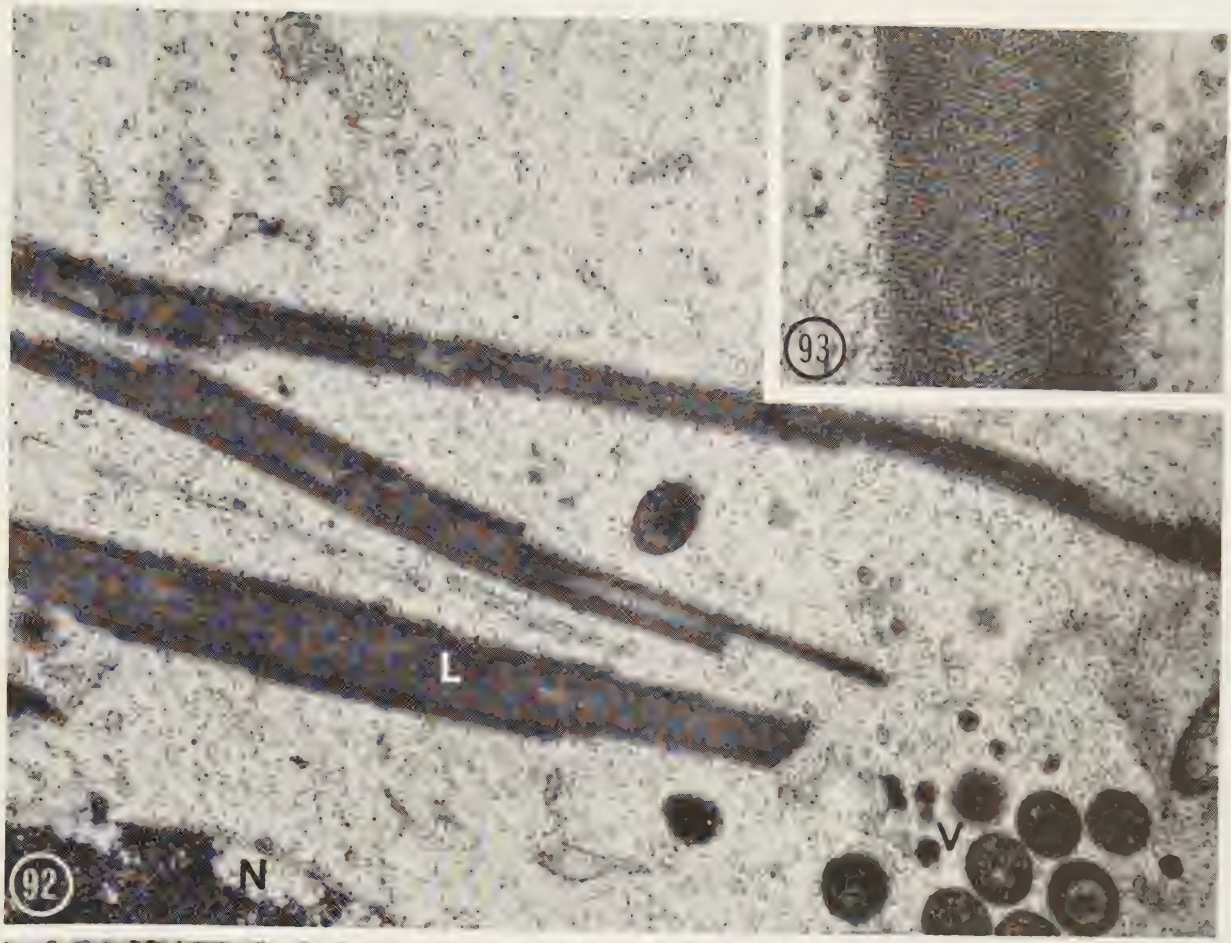

91

P L A N C H E XXVIII

Fig. 92 et 93 : Faisceaux de lamelles (L) associées aux aires de virogénèse. A fort grossissement les lamelles présentent une structure en chevrons (Fig. 93). N : noyau ; V : particules virales immatures.
Fig. 92 : X 16.000
Fig. 93 : X 65.000

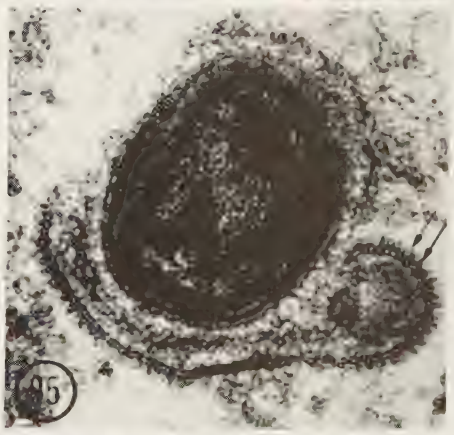
Fig. 94 : Particules virales de type 5 enveloppées dans une membrane supplémentaire (m).
X 73.000

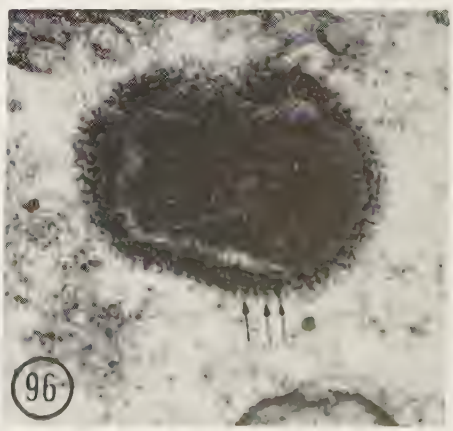
Fig. 95 et 96 : Particules virales mûres partiellement (Fig. 95) ou complètement (Fig. 96) enveloppées par une membrane supplémentaire portant sur sa surface externe de petits spicules (flèches).
Fig. 95 : X 97.000
Fig. 96 : X 85.000


L
N
V
92

93

m
m
94


95


96

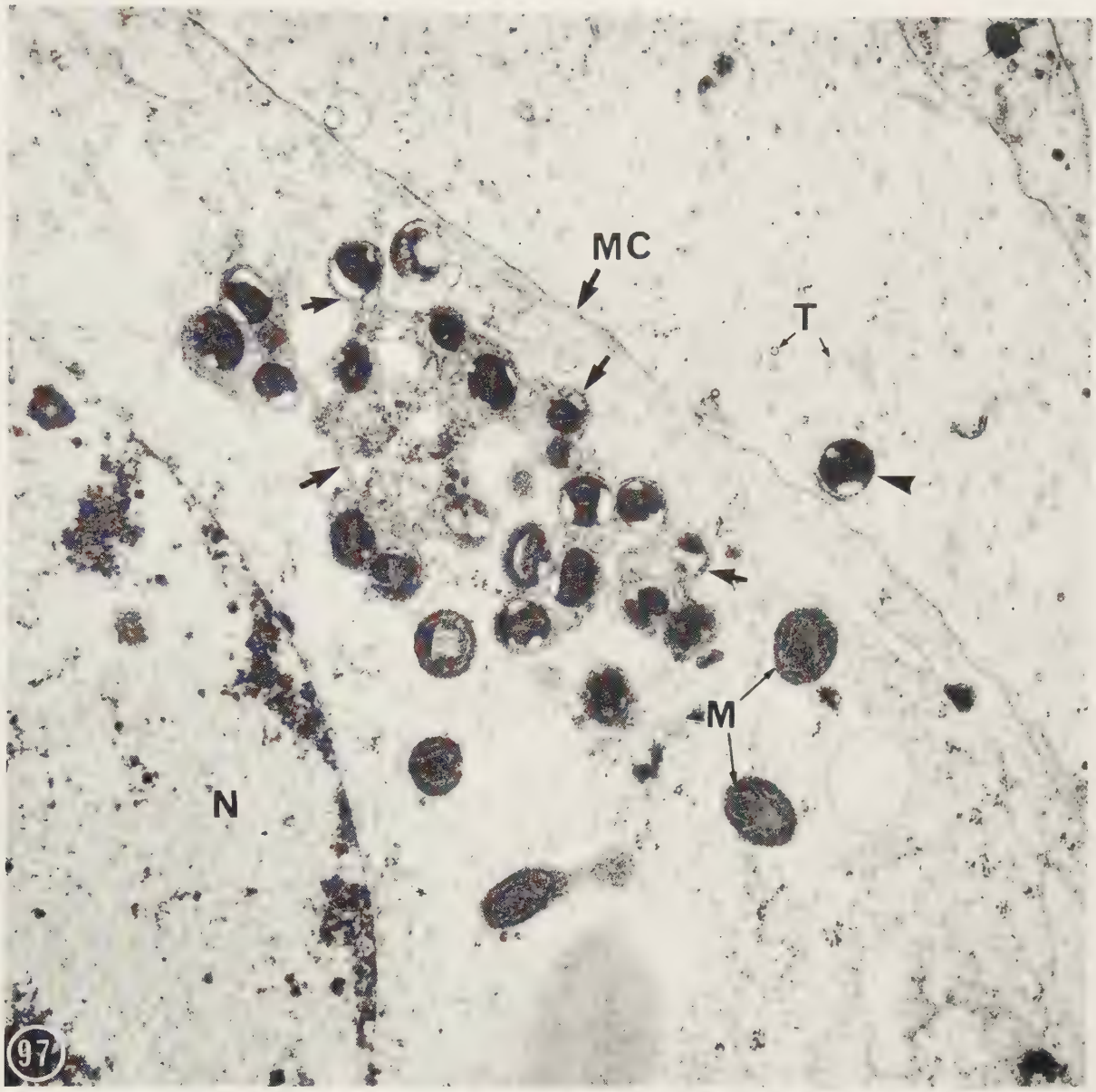
P L A N C H E XXIX

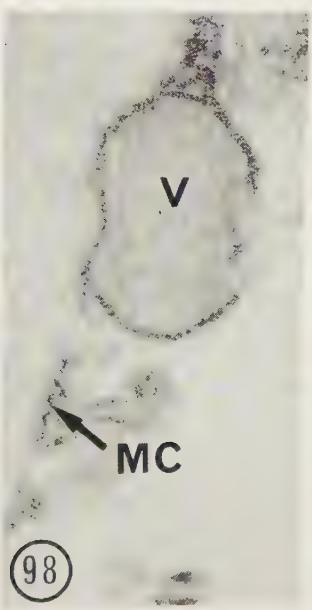
Expulsion des virions libres
des cellules du tissu adipeux.

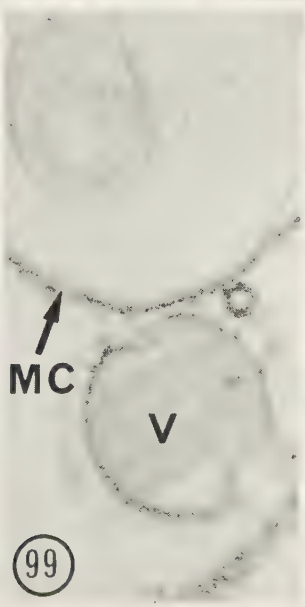
Fig. 97 : Amas de virions au voisinage de la membrane cellulaire (MC) entourés d'un complexe membranaire (flèches longues). On reconnaît dans l'espace intercellulaire un virion expulsé (flèche courte). N : noyau ; M : mitochondries ; T : tubules dans l'espace intercellulaire.
X 21.000

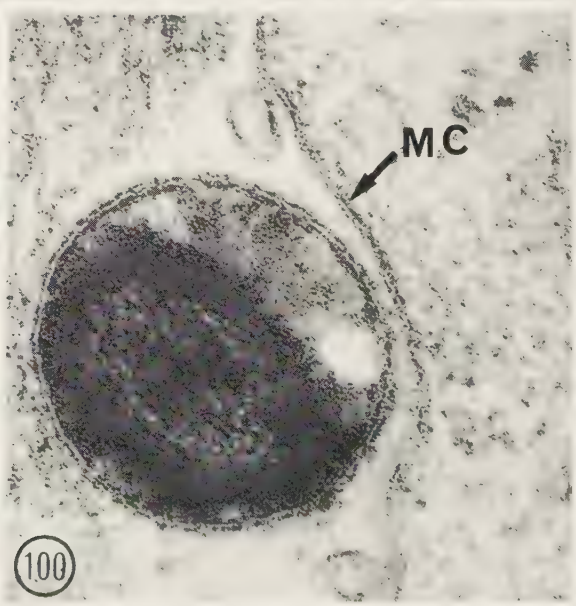
Fig. 98 et 99 : Virions expulsés des cellules adipeuses. Coloration au rouge de ruthénium. Les membranes cytoplasmiques (MC) et la surface des virions (V) sont fortement contrastés par le colorant.
X 78.000

Fig. 100 : Virion expulsé dans l'espace intercellulaire ne possédant pas d'enveloppe supplémentaire. MC : membrane cytoplasmique.
X 135.000


MC
T
M
N
97


V
MC
98

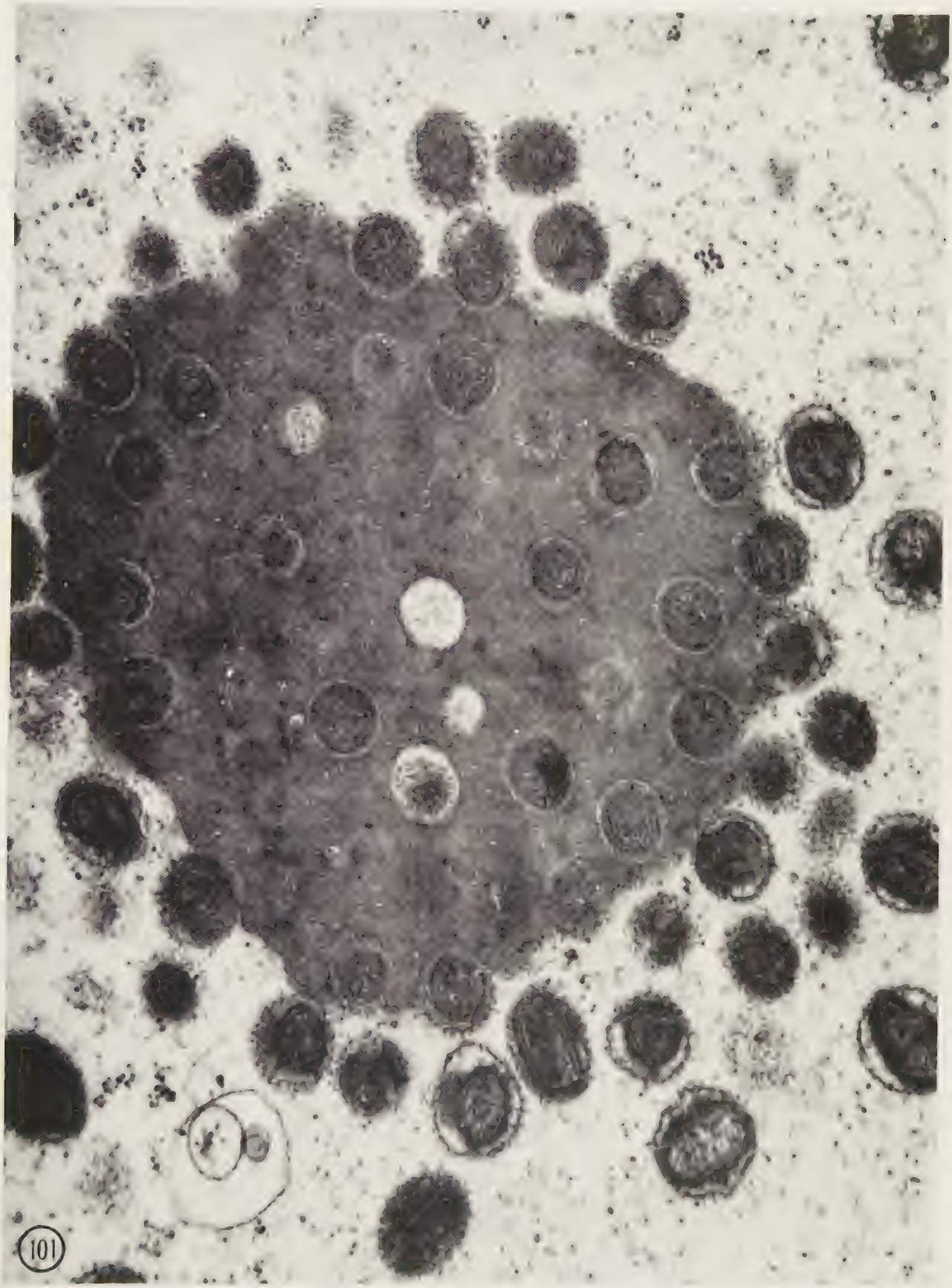

MC
V
99


MC
100

P L A N C H E XXX

Inclusion des virions dans les sphérules.

Fig. 101 : Vue d'ensemble d'une sphérule en voie de formation. A la périphérie de la protéine cristallisée plusieurs virions sont en cours d'inclusion.
X 43.000

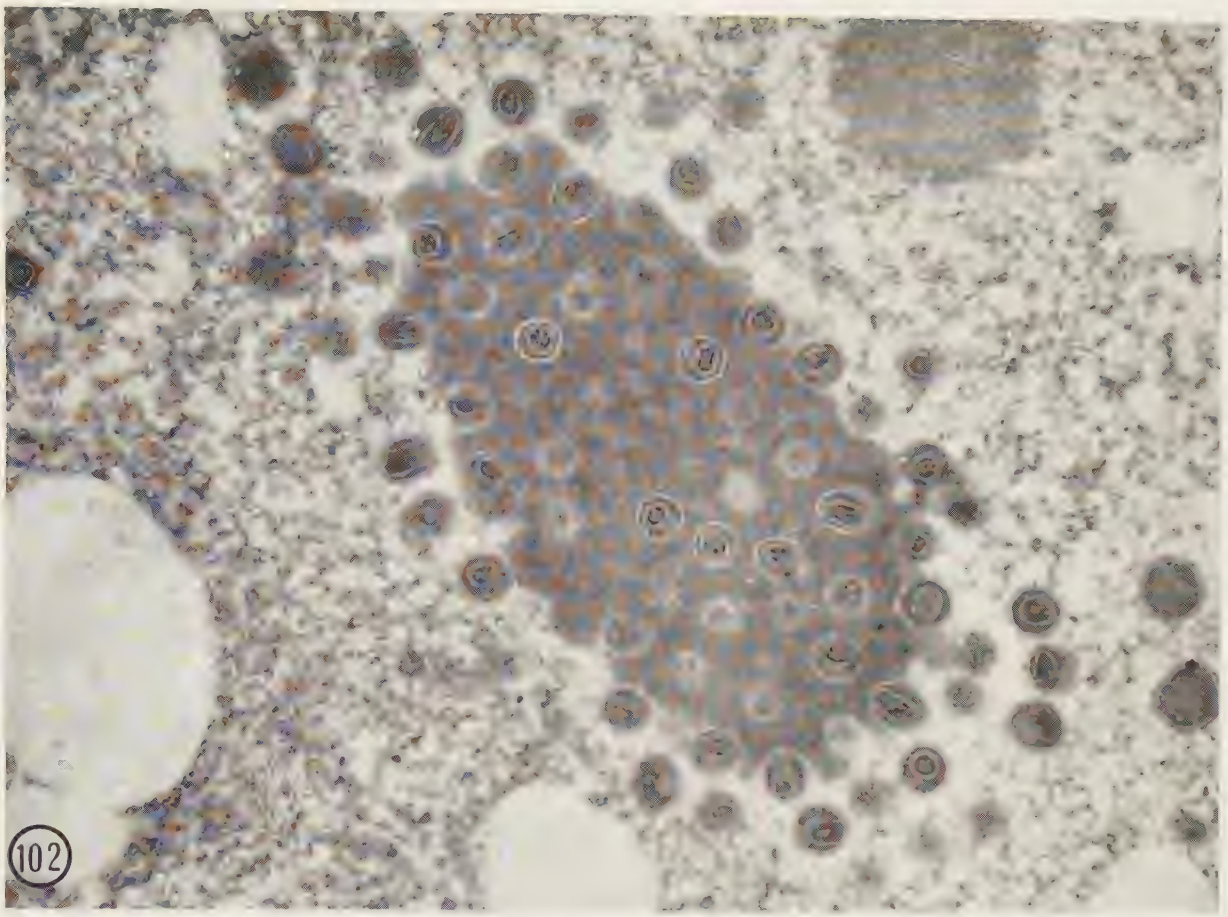

101

P L A N C H E XXXI

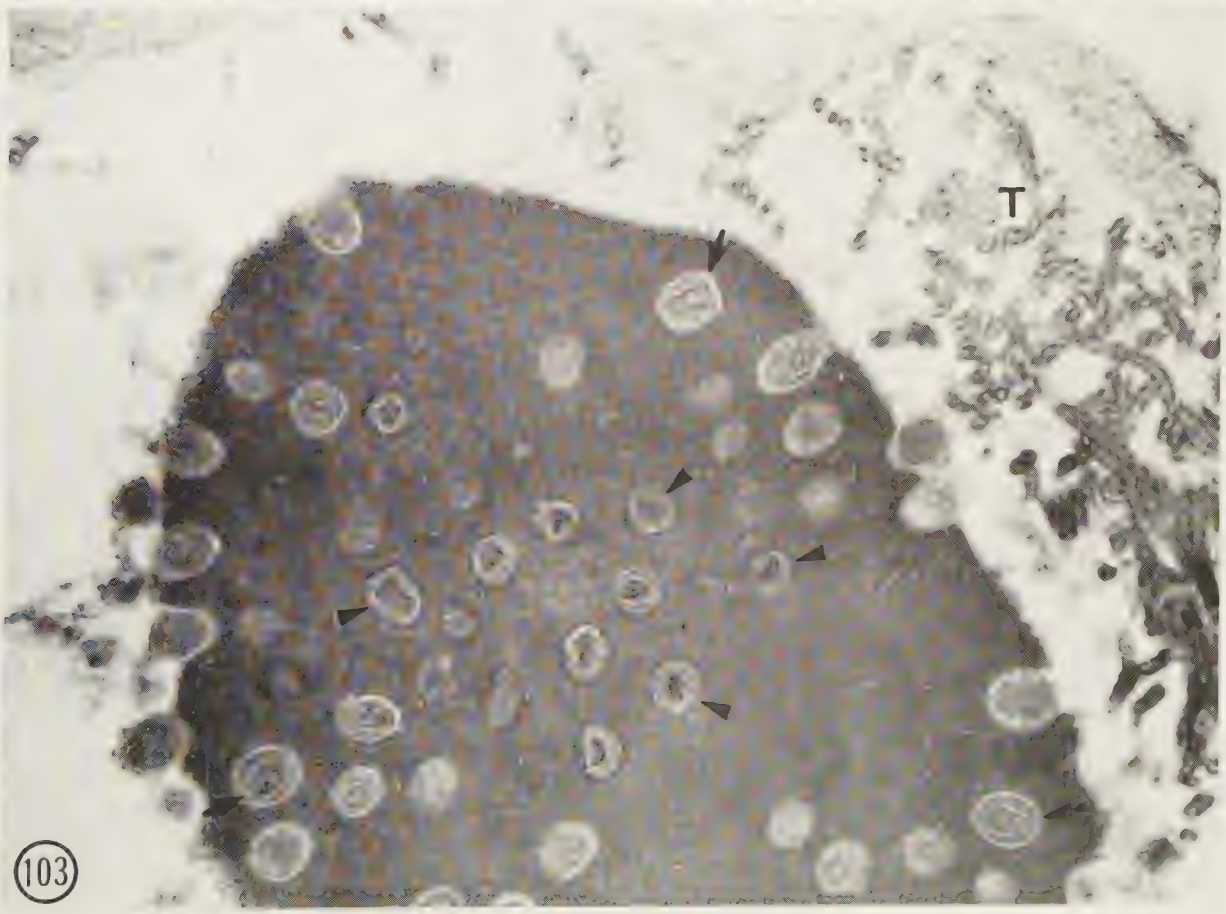
Inclusion des virions dans les sphérules.

Fig. 102 : Vue d'ensemble, sur coupe en GMA, d'une sphérule en cours de développement. Noter la concentration en virions tout autour de l'inclusion.
X 17.000

Fig. 103 : Mise en évidence des glycoprotéines selon la technique de RAMBOURG (1967), sur coupe en GMA. Le nucléoïde ainsi que le hâlo entourant les virions situés à la périphérie de l'inclusion (flèches longues) ne sont pas colorés, alors que ces mêmes structures sont nettement contrastées dans les virions inclus plus profondément (flèches courtes).
T : tubules situés dans les espaces extra cellulaires.
X 23.000



102



103

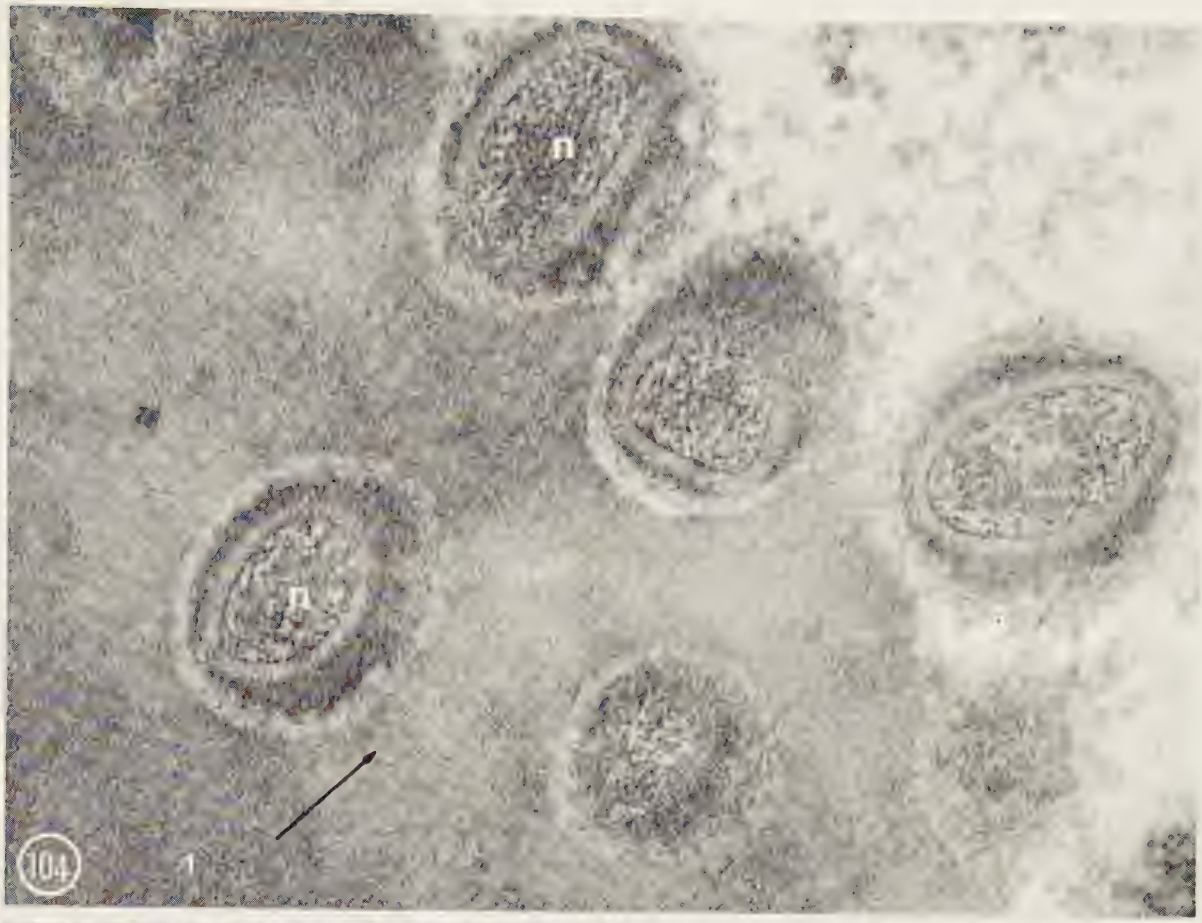
P L A N C H E XXXII

Inclusion des virions dans les sphérules

Fig. 104 et 105 : Détails de l'incorporation des virions dans les sphérules. La trame protéinique cristalline (flèche) enrobe progressivement les virions situés à la périphérie de l'inclusion (Fig. 104). Les virions en voie d'inclusion ou inclus peu profondément présentent un nucléoïde (n) dont la structure est fibrillaire. Le hâlo (h) qui les entoure est discret. Par contre, la structure filamenteuse dans le nucléoïde du virion situé plus à l'intérieur de l'inclusion (Fig. 105, en haut à gauche) se distingue nettement. En outre, le hâlo entourant ce virion est plus large.

Fig. 104 : X 93.000

Fig. 105 : X 93.000


n
n
104

h
n
cl
h
n
cl
105

P L A N C H E XXXIII

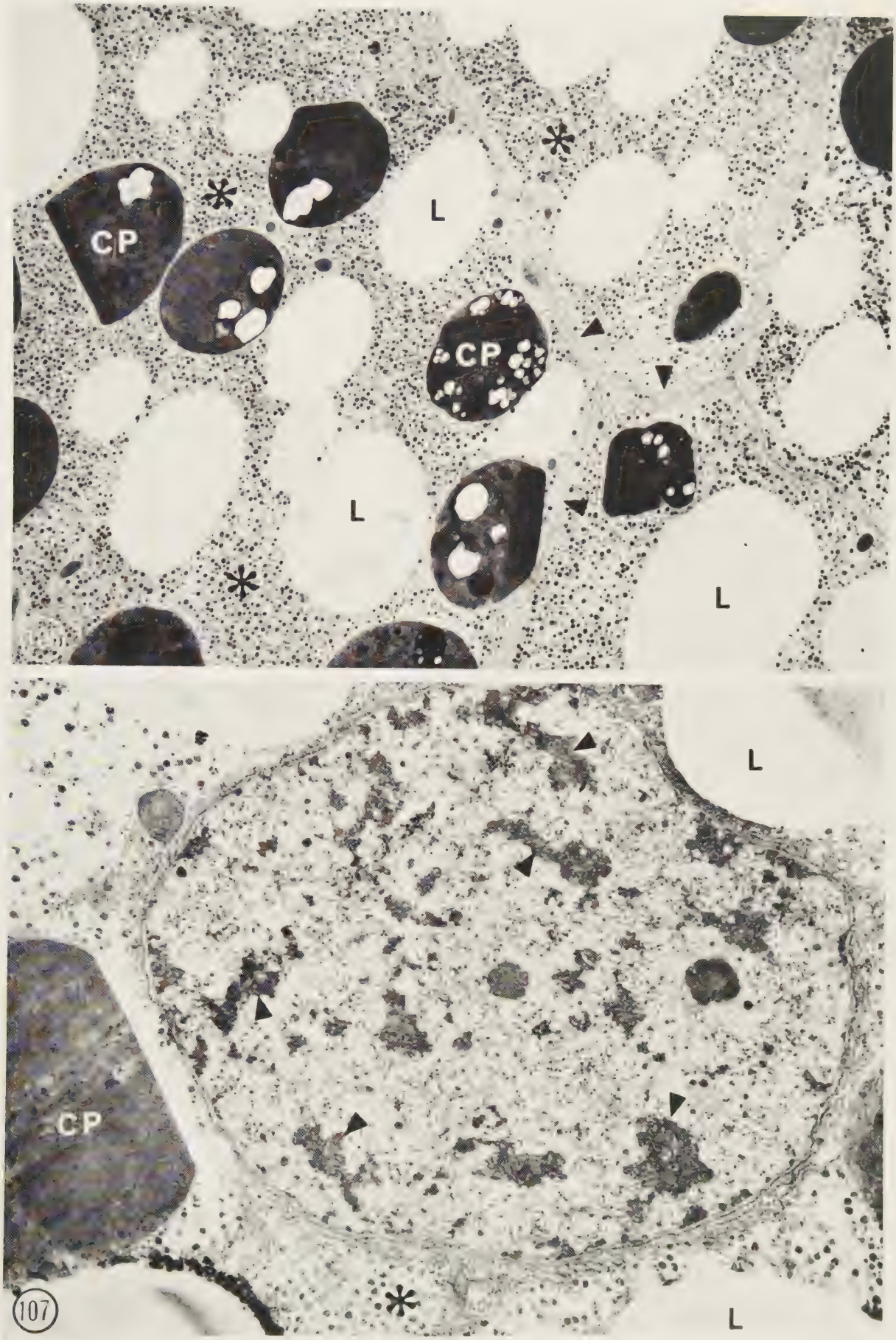
Ultrastructure des cellules saines
du tissu adipeux de *Melolontha*

Fig. 106 : Les cellules adipeuses des larves L_3 sont riches en enclaves cytoplasmiques de réserves dont on distingue trois types :

- rosettes de glycogène (astérisques) ;
- corps protéiniques (CP) à contours ovales ou anguleux et à structure hétérogène ;
- gouttelettes de lipides (L).

Les membranes cytoplasmiques (flèches) des cellules adjacentes sont étroitement accolées les unes aux autres.
X 6.000

Fig. 107 : Noyau d'une cellule saine présentant un nucléoplasme peu dense aux électrons dans lequel sont dispersés de nombreux amas chromatiniens (flèches). La double membrane nucléaire est d'épaisseur régulière et elle est entourée de rangées concentriques d'ergastoplasme. Le noyau est comprimé par des enclaves lipidiques (L) et protéiniques (CP).
Astérisque : glycogène en rosettes.
X 13.000


CP
CP
CP
L
L
L
L
L
L

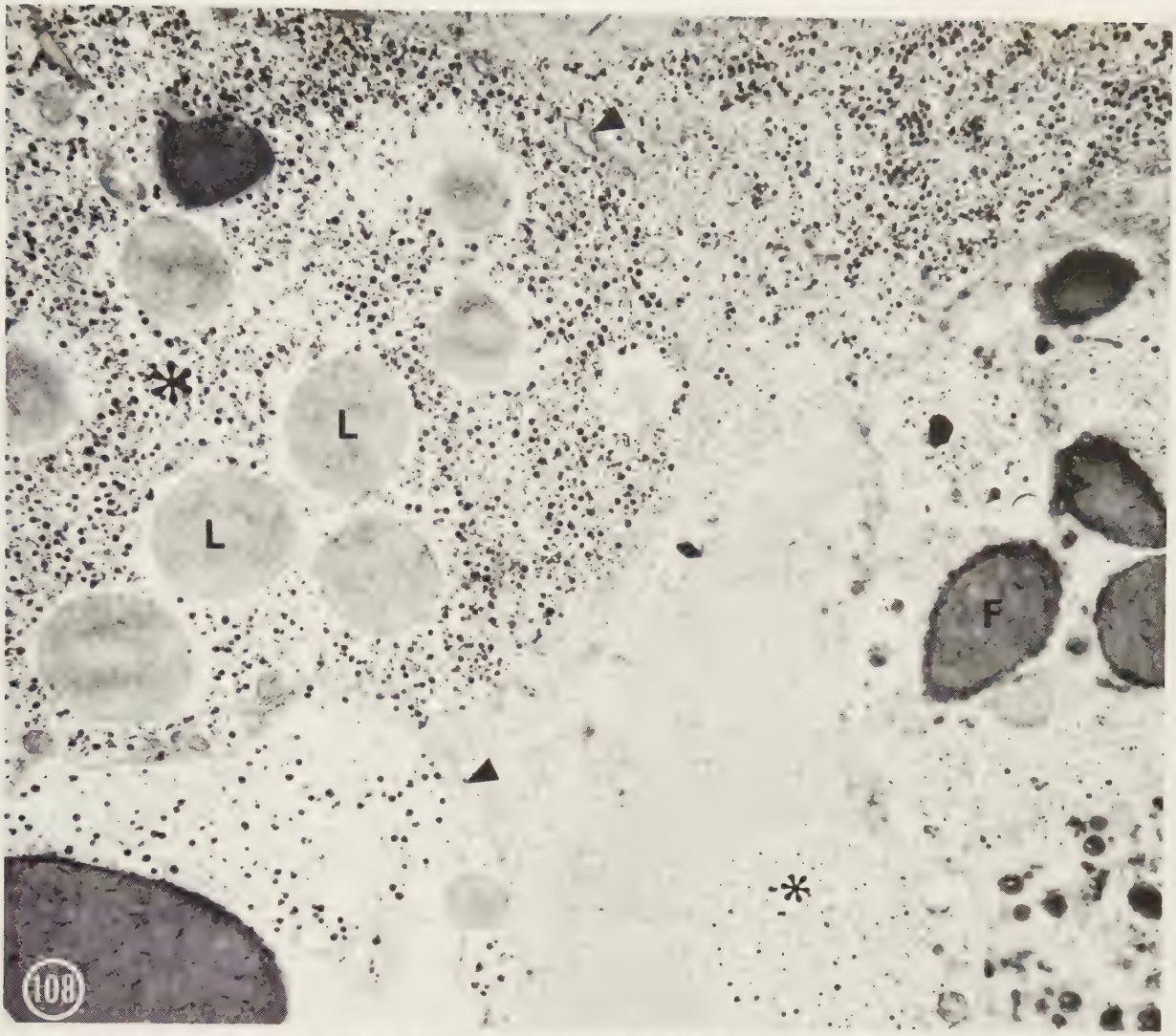
P L A N C H E XXXIV

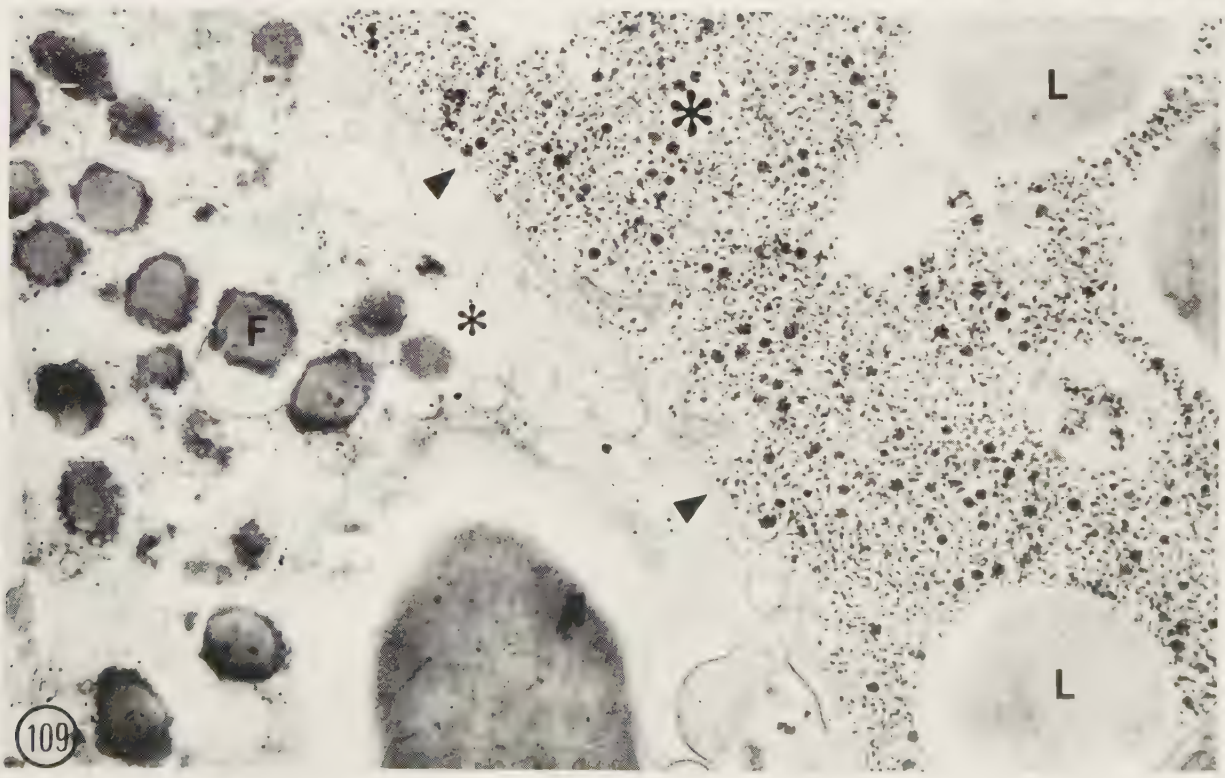
Ultrastructure des cellules du tissu adipeux de *Melolontha* infectées par l'entomopoxvirus. Altérations cytoplasmiques.

Fig. 108 et 109 : Cellules après traitement à l'acide périodique-TCH-protéinate d'argent. Les enclaves de réserves ont considérablement diminué dans les cellules infectées qui possèdent des fuseaux (F). En particulier, le glycogène α en rosettes (gros astérisques) a presque complètement disparu et le test de Thiery révèle seulement des grains de glycogène β de 100-200 Å de diamètre (petits astérisques) dans ces cellules. Par contre, les cellules non encore envahies par le virus (Fig. 108, en haut à gauche ; Fig. 109, à droite) possèdent de nombreuses enclaves à glycogène α et des enclaves lipidiques (L). Les membranes cytoplasmiques (flèches) se détachent les unes des autres et l'on note de nombreux tubules dans les espaces intercellulaires ainsi formés.

Fig. 108 : X 6.000

Fig. 109 : X 15.000


L
L
F
108


L
F
L
109

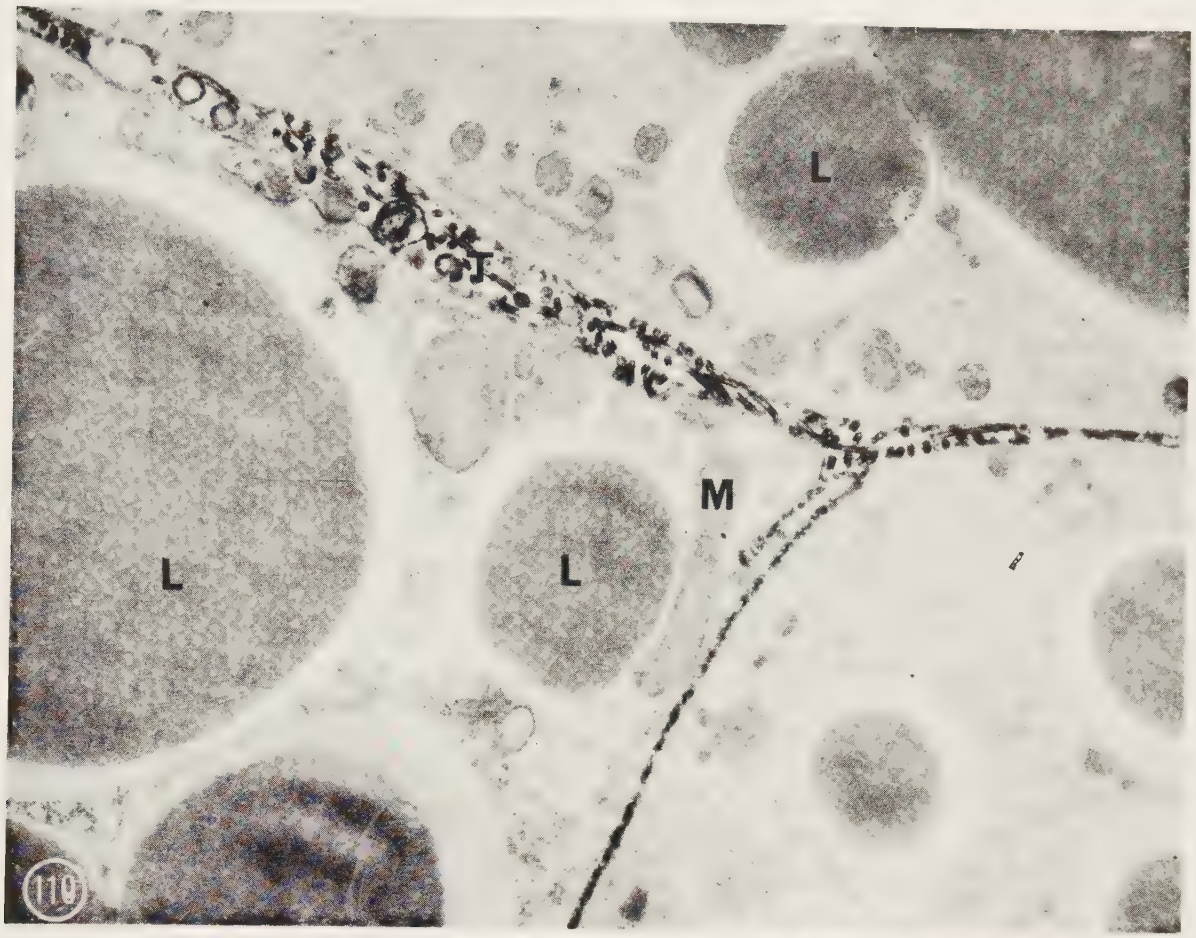
P L A N C H E XXXV

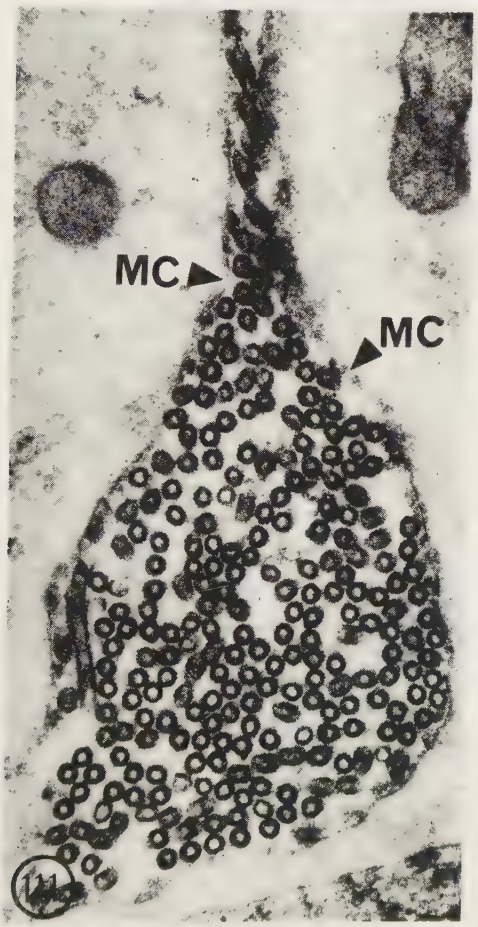
Ultrastructure des cellules du tissu adipeux de *Melolontha* infectées par l'entomopoxvirus. Les tubules intercellulaires.

Fig. 110 et 111 : Après fixation par le glutaraldéhyde et le rouge de ruthénium, les tubules (T) situés dans les espaces intercellulaires sont fortement contrastés. L : lipides ; M : mitochondries ; MC : membranes cellulaires.
Fig. 110 : X 18.000
Fig. 111 : X 43.000

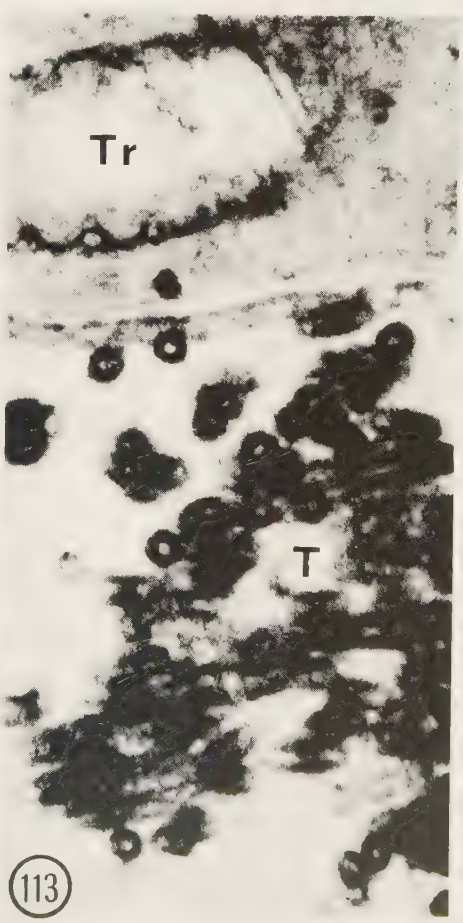
Fig. 112 : Détail à fort grossissement d'un tubule montrant sa structure hélicoïdale (flèches).
X 145.000

Fig. 113 : Mise en évidence des glycoprotéines par le test de RAMBOURG sur coupes en GMA. Les tubules (T) sont fortement contrastés par la réaction. On notera également la coloration intense de la paroi chitineuse de la trachéole (Tr).
X 45.000


L
L
L
M
110


MC
MC
111

112


Tr
T
113

P L A N C H E XXXVI

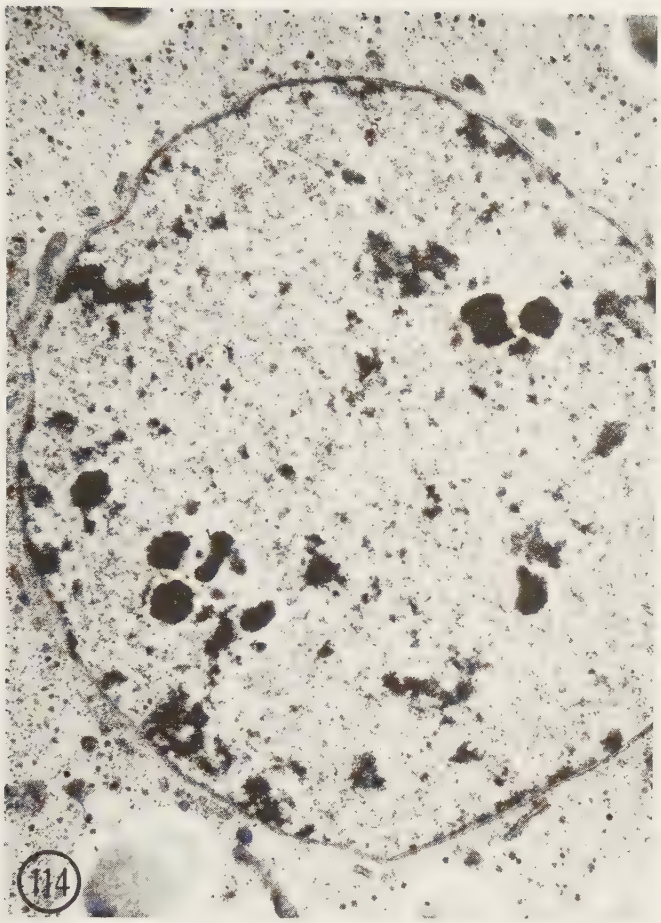
Ultrastructure des cellules du tissu adipeux de *Melolontha* infectées par l'entomopoxvirus. Altérations du noyau.

Fig. 114 : Noyau d'une cellule en début d'infection. Le nucléoplasme est légèrement éclairci et les amas chromatiniens sont moins abondants que dans les noyaux des cellules saines (voir Fig. 107).
X 8.500

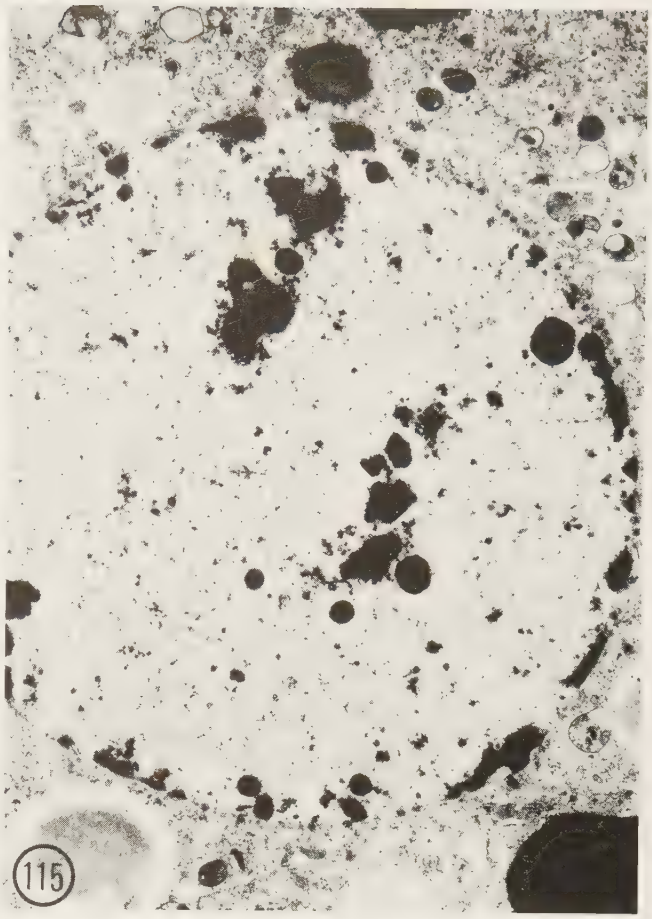
Fig. 115 : Noyau d'une cellule à un stade moyen d'infection. Par rapport à la figure précédente, le nucléoplasme est considérablement éclairci et les amas chromatiniens moins nombreux sont localisés à la périphérie du noyau.
X 6.000

Fig. 116 : La réaction à l'acide périodique-TCH-protéinate d'argent met en évidence dans le nucléoplasme d'un noyau profondément altéré de petits grains de glocogène β (astérisque) comparables à ceux révélés dans le cytoplasme. Les membranes externe et interne de ce noyau sont délaminées (flèches). Chr : mottes de chromatine plaquées contre la membrane interne du noyau.
X : 18.000

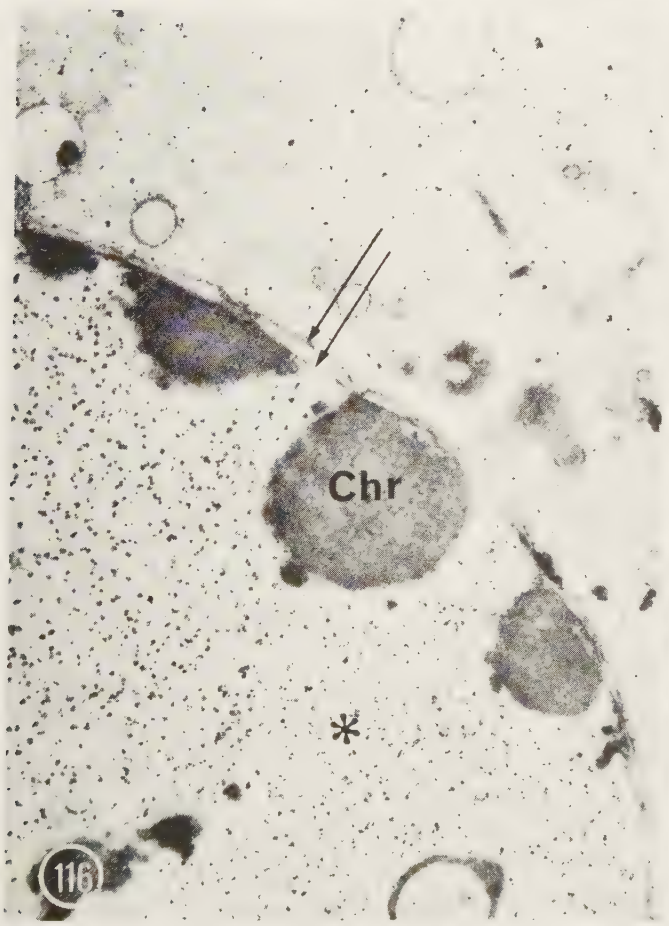
Fig. 117 : A un stade avancé de l'infection, la structure du noyau est profondément modifiée. De petits tubules (T) ayant une structure comparable à ceux décrits dans les espaces intercellulaires (voir Planche XXXV) apparaissent dans le nucléoplasme.
X 7.500



114



115



116

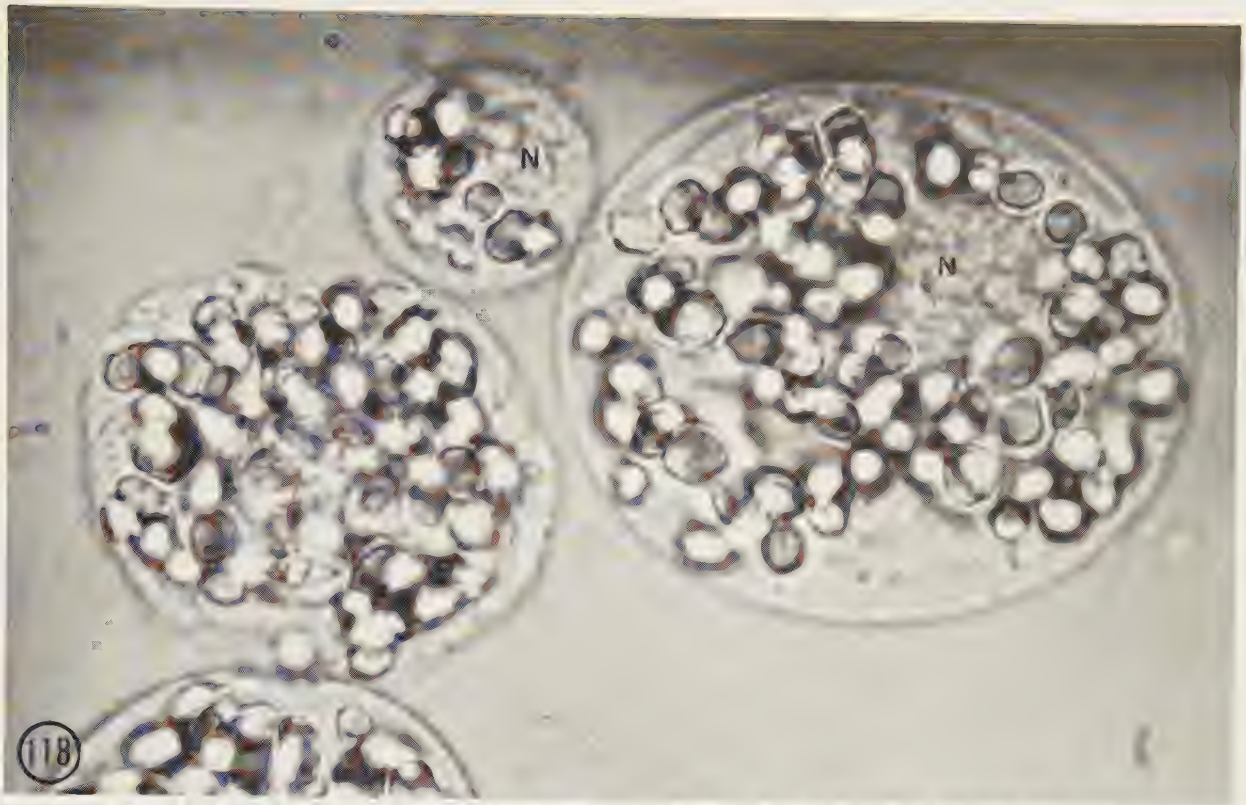
117

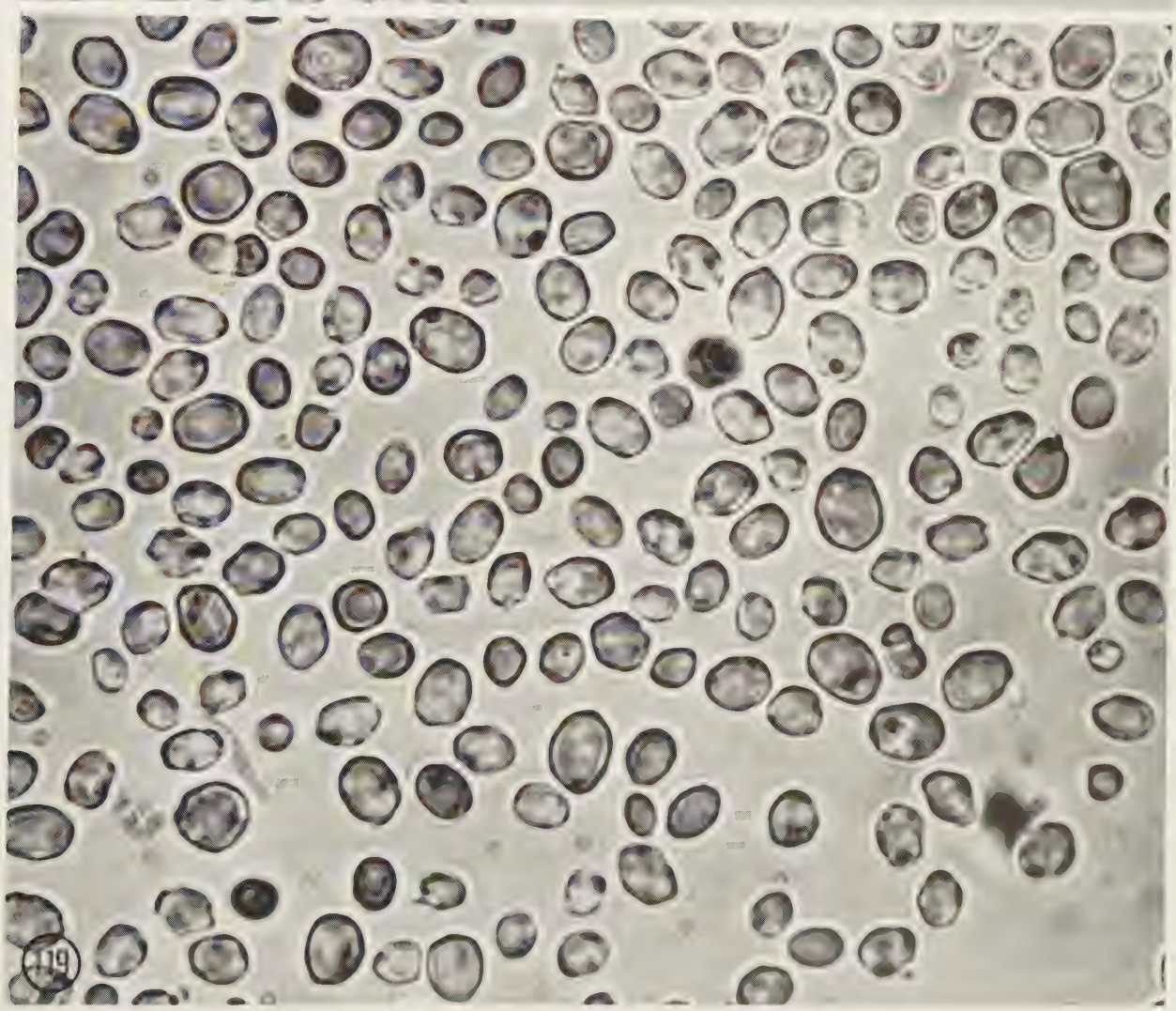
P L A N C H E XXXVII

Inclusions de l'entomopoxvirus d'*Amsacta* observées au microscope photonique.

Fig. 118 : Hémocytes d'*Arctia caja* infectés par l'entomopoxvirus d'*Amsacta*. Observation entre lame et lamelle, en fond clair. Le cytoplasme des hémocytes est rempli d'inclusions ovoïdes. N : noyau.
X 600

Fig. 119 : Suspension purifiée d'inclusions observée au microscope en fond clair.
X 700


N
N
118


119

P L A N C H E XXXVIII

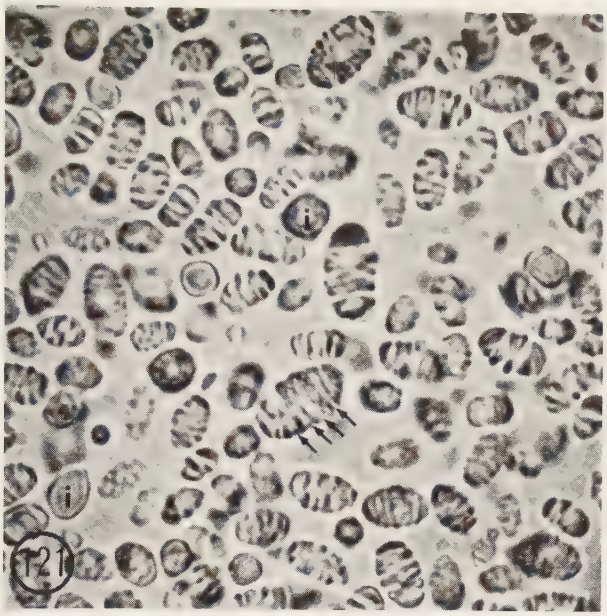
Fig. 120 : Coupe ultra-fine dans une inclusion de l'entomopoxvirus d'*Amsacta*. Les virions sont régulièrement répartis dans la trame cristalline de la protéine d'inclusion. On notera le contour bosselé de l'inclusion, correspondant à des virions inclus ou en voie de l'être.
X 55.000

P L A N C H E XXXIX

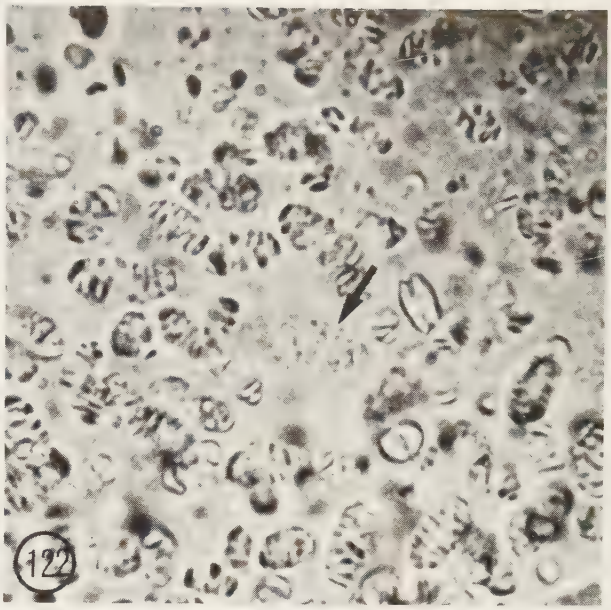
Dissolution des inclusions dans une solution de thioglycolate 0,125 M dans un tampon carbonate-bicarbonate 0,16 M à pH 10,5.

Fig. 121 et 122 : Dissolution des inclusions observées au microscope photonique en fond clair. On reconnaît sur la figure 121 des inclusions intactes (i) et des inclusions craquelées (flèches). A un stade plus avancé de la dissolution (Fig. 122) les inclusions perdent leur réfringence et l'on distingue à l'intérieur les virions qui apparaissent comme de petites granulations réfringentes (flèche).
Fig. 121 : X 500
Fig. 122 : X 500

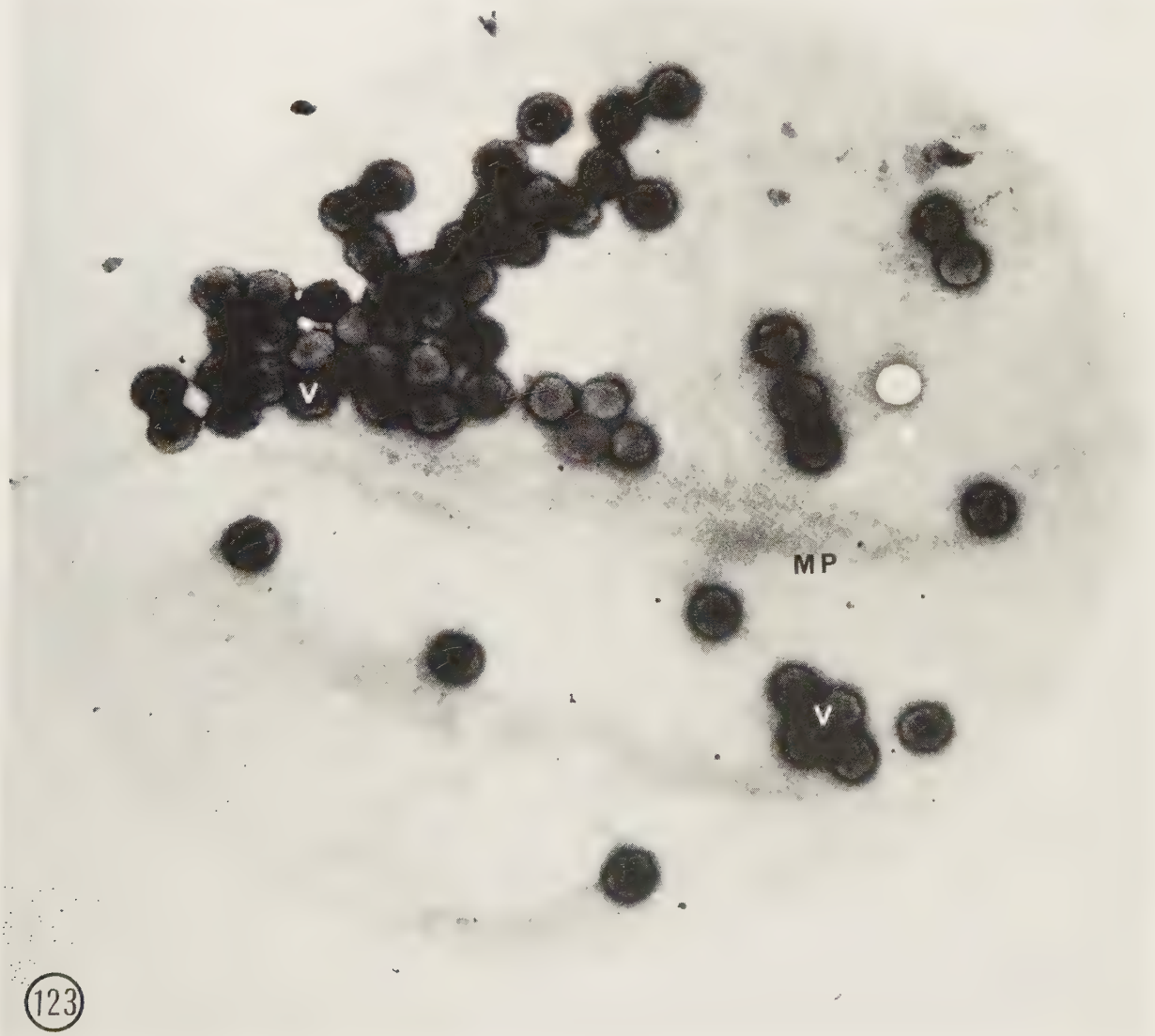
Fig. 123 : Dissolution des inclusions observée au microscope électronique. Les inclusions déposées sur grille porte-objet sont laissées en contact pendant 30 secondes avec la solution de thioglycolate, puis lavées par l'APT qui sert en même temps de colorant négatif. La matrice protéinique (MP) de l'inclusion s'est partiellement dissoute et a perdu son opacité aux électrons tandis que les virions (V) qu'elle renferme se distinguent nettement.
X 17.000



121



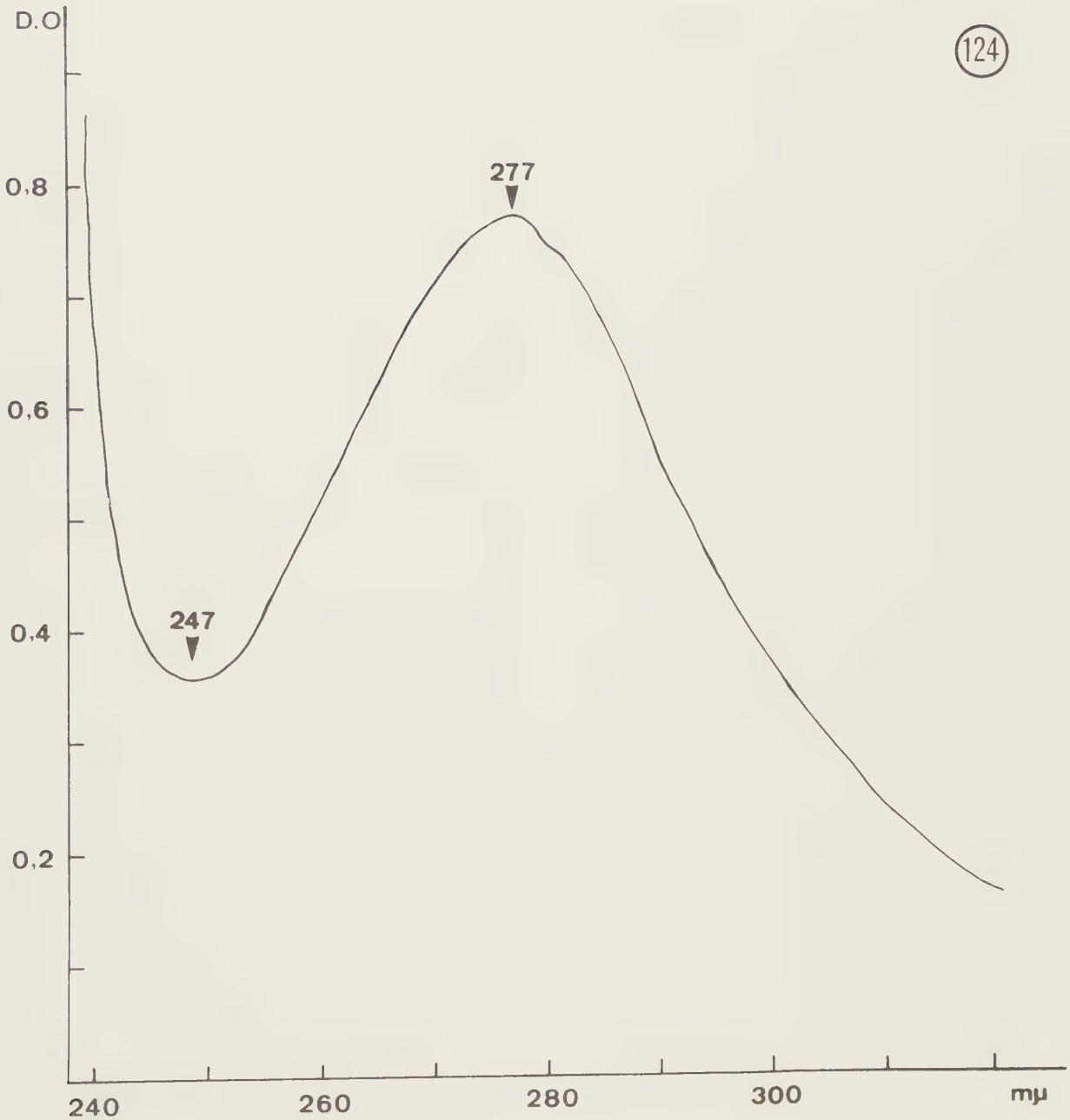
122



123

P L A N C H E XL

Fig. 124 : Spectre d'absorption dans l'ultra-violet d'une solution de protéine(s) d'inclusions de l'entomopoxvirus d'*Amsacta*. Tampon Tris-HCl 0,05 M à pH 7,4.


D.O
0,8
0,6
0,4
0,2
277
247
240
260
280
300
mμ

P L A N C H E XLI

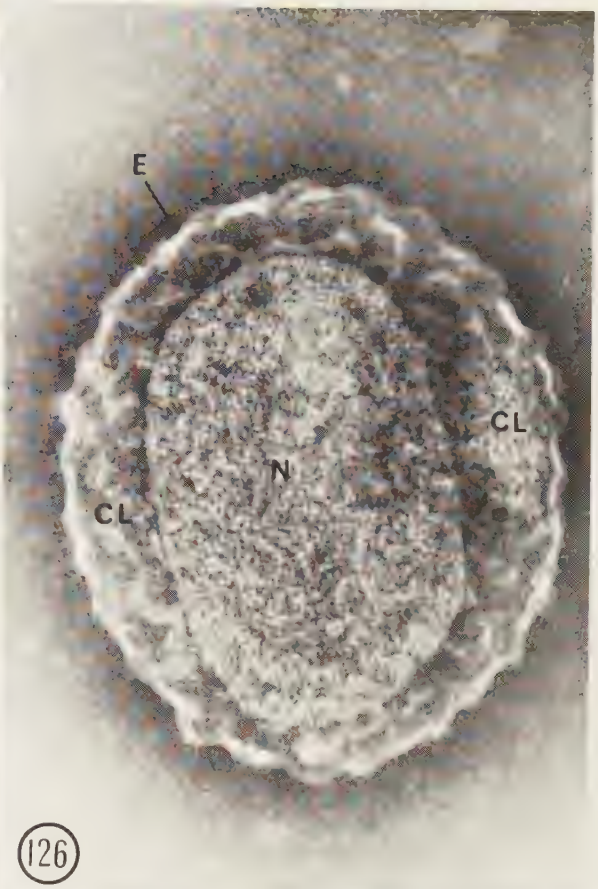
Ultrastructure des virions de 1'entomopoxvirus d'*Amsacta* purifiés par dissolution des inclusions. Morphologie des virions intacts et dégradés, observés après coloration négative à 1' APT.

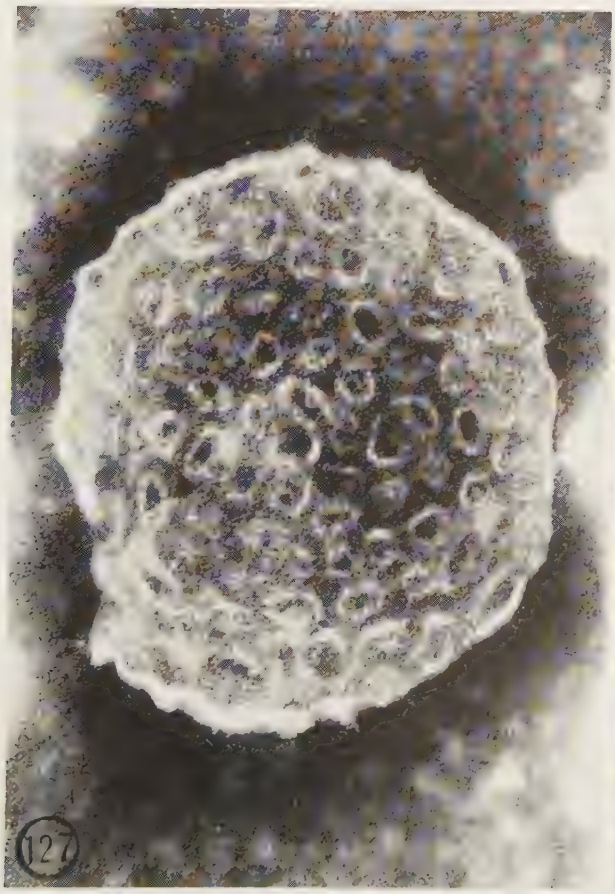
Fig. 125 : Virion non pénétré par 1'APT. Sa forme est ovale (3.500 Å x 2.500 Å) et sa surface porte des éléments globuleux d'environ 400 Å de diamètre. Comme pour les virions de 1'entomopoxvirus de *Melolontha* (voir Fig. 44, Pl. XVI), 1'aspect mûriforme de la particule est caractéristique.
X 240.000

Fig. 126 : Lorsque 1'APT a pénétré dans la particule, il révèle à 1'intérieur d'une enveloppe festonnée (E), un nucléoïde cylindrique (N) flanqué de deux corps latéraux discrets (Cl).
X 160.000

Fig. 127 et 128 : Enveloppe vide (Fig. 126) et nucléoïde libre (Fig. 127) observés dans les suspensions de virus laissées en contact prolongé avec la solution de thioglycolate utilisée pour dissoudre les inclusions. Les éléments globuleux qui ornent la surface des virions intacts se distinguent nettement sur 1'enveloppe vide. La surface du nucléoïde porte des éléments tubulaires (flèches).
Fig. 127 : X 160.000
Fig. 128 : X 260.000

125


E
CL
N
CL
126


127

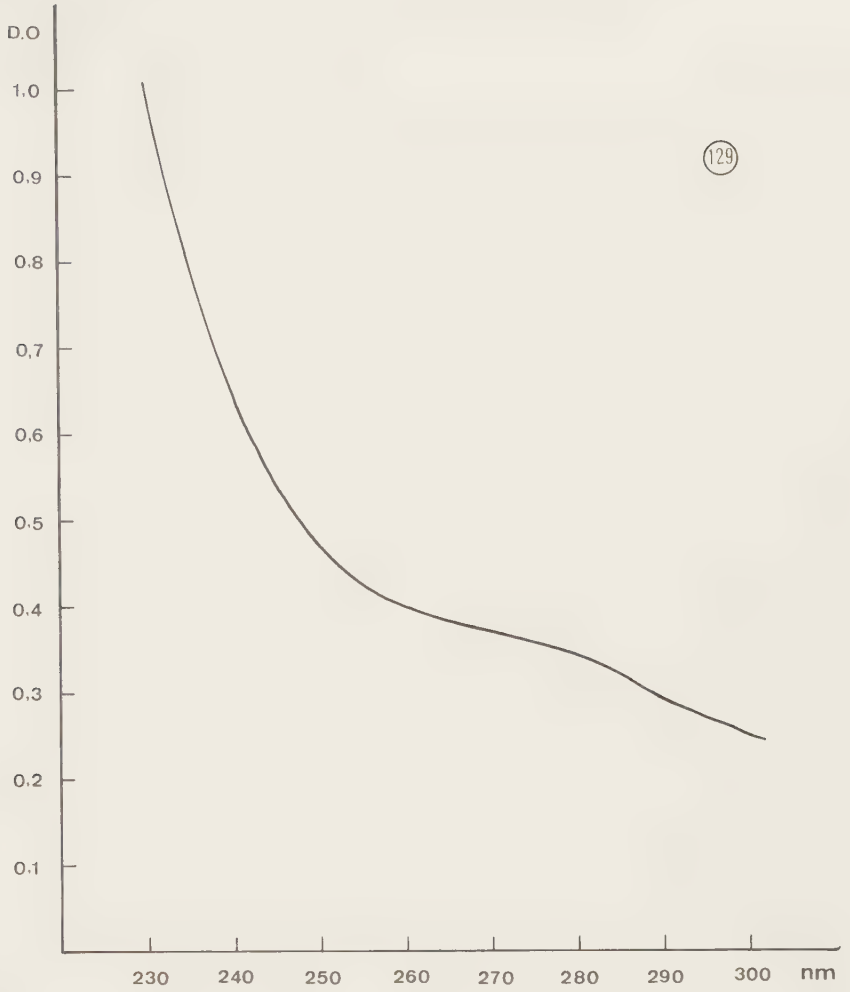
128

P L A N C H E XLII

Spectre d'absorption dans l'ultra-violet
d'une suspension purifiée de virus
de l'entomopoxvirus d'*Amsacta*

Fig. 129 : Spectre enregistré. Comme pour les suspensions de virions de l'entomopoxvirus de *Melolontha* (voir Fig. 78, Pl. XXIV), l'absorption spécifique de la nucléoprotéine virale est masquée par la diffraction de la lumière due à la grande taille des particules. On note seulement un épaulement entre 280 nm et 260 nm.

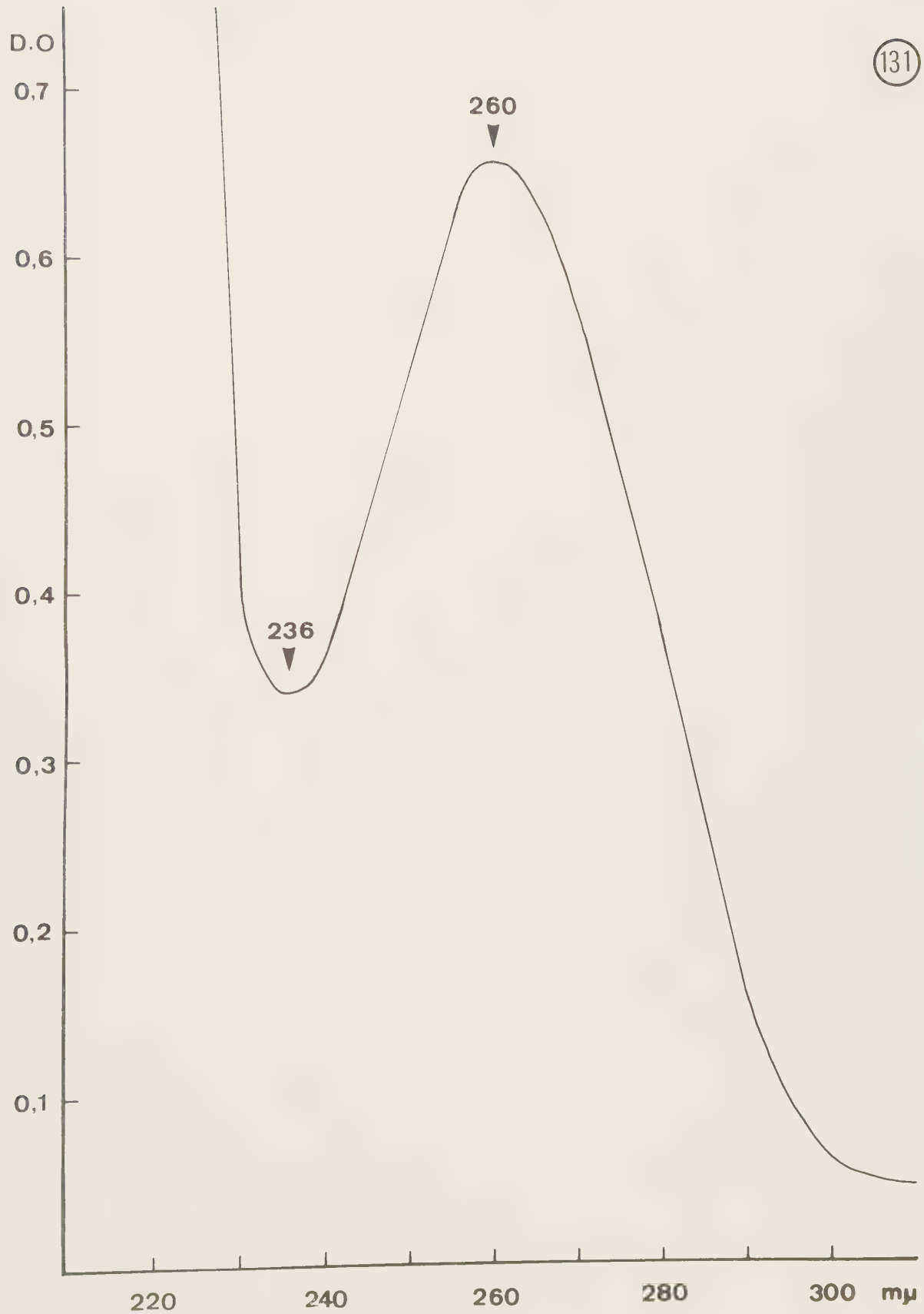
Fig. 130 : Après correction pour la diffraction de la lumière selon la méthode de BONHOEFFER et SCHACHMANN (1960), le spectre présente un maximum vers 275 nm et le rapport DO_{260}/DO_{280} est de 0,85.


D.O
1.0
0.9
0.8
0,7
0,6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
230
240
250
260
270
280
290
300
nm
129

D.O
0.3
0.2
0.1
230
240
250
260
270
280
290
300
nm
130

P L A N C H E XLIII

Fig. 131 : Spectre d'absorption dans l'ultra-violet d'une solution d'ADN extrait des virions de l'entomopoxvirus d'*Amsacta*. Le tampon utilisé pour solubiliser l'ADN est du citrate de soude 0,015 M + ClNa 0,15 M à pH 7,0.


D.O
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
260
236
220
240
260
280
300
mμ

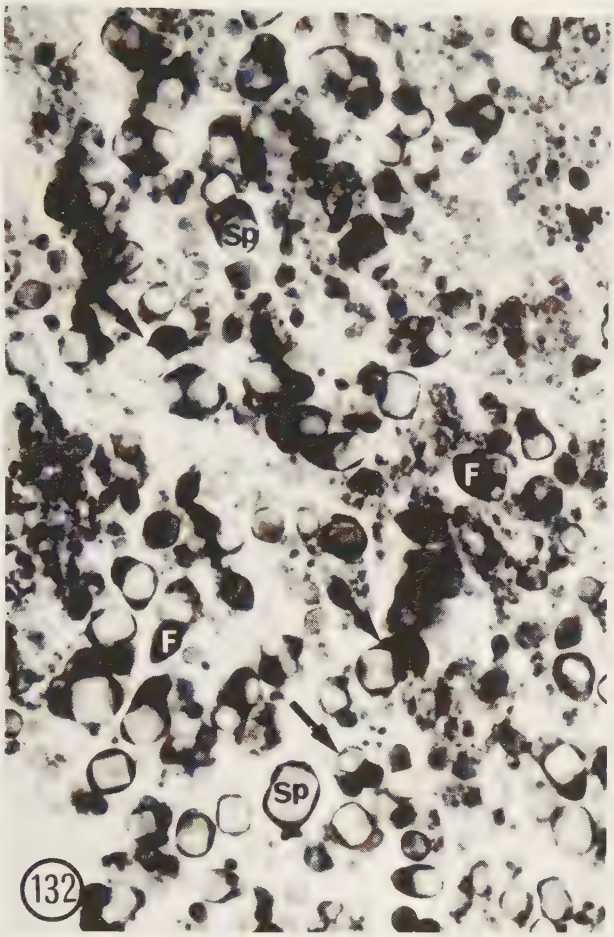
P L A N C H E XLIV

L'entomopoxvirus du Coléoptère *Demodena boranensis*.
Aspects histo et cytopathologiques.

Fig. 132 : Coupe histologique dans un lobe de tissu adipeux de larve fortement atteinte. Sp : inclusions de type sphérule. F : inclusions de type fuseaux. Parfois ces deux types d'inclusions forment des agglomérats (flèches).
X 700

Fig. 133 : Coupe ultra-fine dans une inclusion de type sphérule. Les virions présentent l'architecture des entomopoxvirus de coléoptères, à savoir une enveloppe festonnée (flèches), un nucléoïde (n) unilatéralement concave et un seul corps latéral (cl). Le nucléoïde comprend lui-même une coque (c) à 3 feuillets enfermant une substance dense aux électrons et la structure filamenteuse (f).
X 66.000

Fig. 134 : Coupe ultra-fine d'un agglomérat formé d'une inclusion de type sphérule (Sp) et de plusieurs inclusions de type fuseaux (f), réunis par une substance amorphe de forte densité aux électrons. V : virions inclus.
X 9.000



132

133

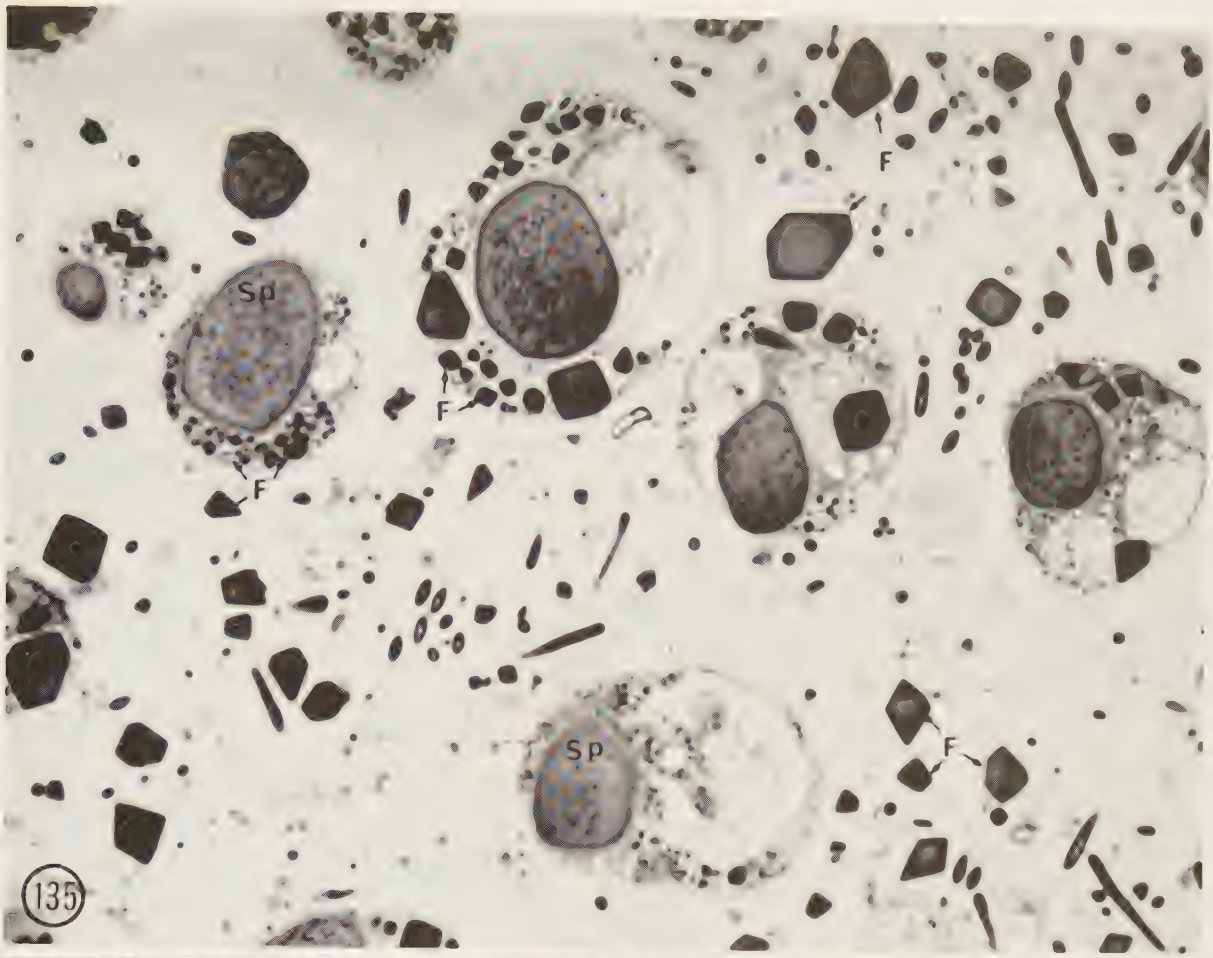
134

P L A N C H E XLV

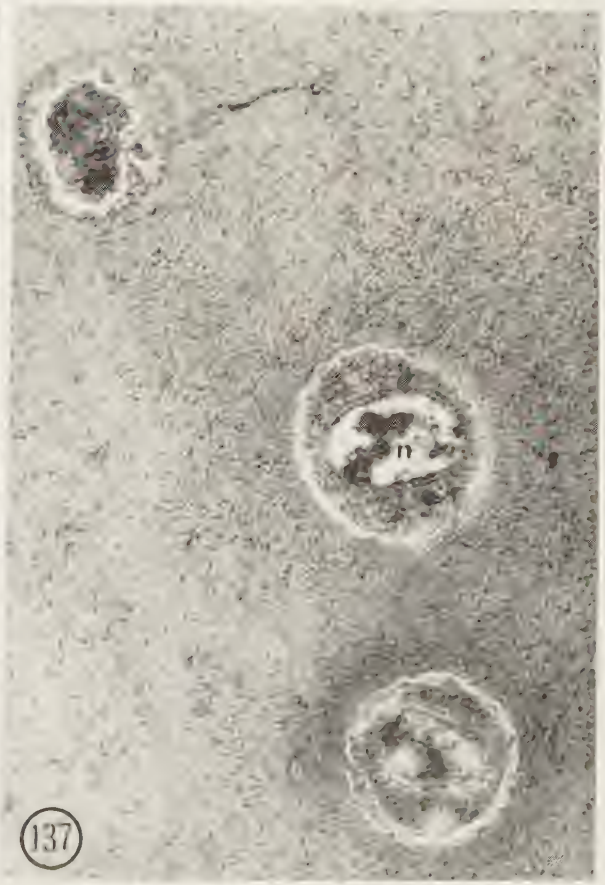
L'entomopoxvirus du Coléoptère *Phyllopertha horticola*.
Aspects histo et cytopathologiques.

Fig. 135 : Coupe semi-fine d'un lobe de tissu adipeux de larve fortement atteinte. Sp : inclusions de type sphérules dans lesquelles s'observent de petites granulations correspondant aux virions inclus. F : inclusions de type fuseaux à contours polygonaux. Les deux types d'inclusions sont fréquemment groupés en îlots cytoplasmiques à contours ovales.
X 1.400

Fig. 136 et 137 : Coupes ultra-fines dans des inclusions de type sphérules. Les virions inclus en profondeur (Fig. 136) présentent l'organisation typique des entomopoxvirus de coléoptères avec un seul corps latéral (cl) logé dans la concavité du nucléoïde (n). e : enveloppe. Les virions inclus à la périphérie (Fig. 137) possèdent un nucléoïde dont la substance fondamente n'est pas différenciée.
X 80.000


Sp
F
F
F
Sp
F
135

e
cl
n
136


n
137

P L A N C H E XLVI

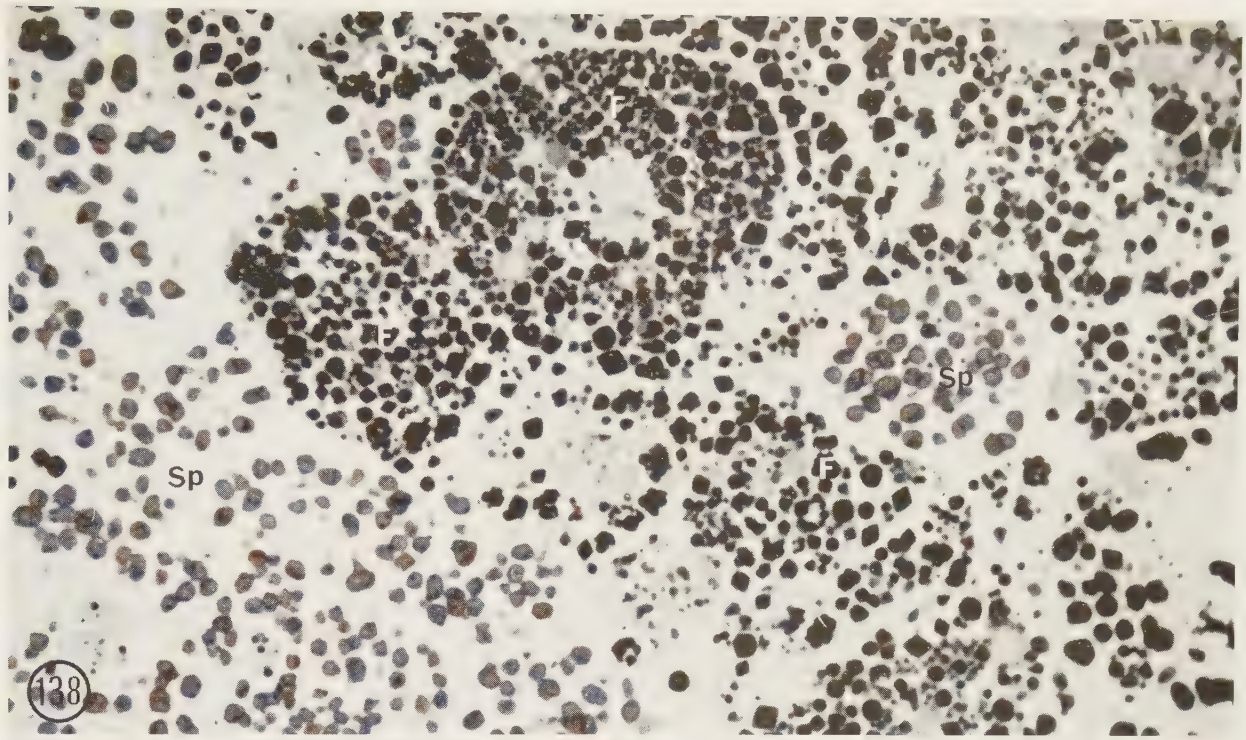
L'entomopoxvirus du Coléoptère *Figulus sublaevis*.
Aspects histo et cytopathologiques.

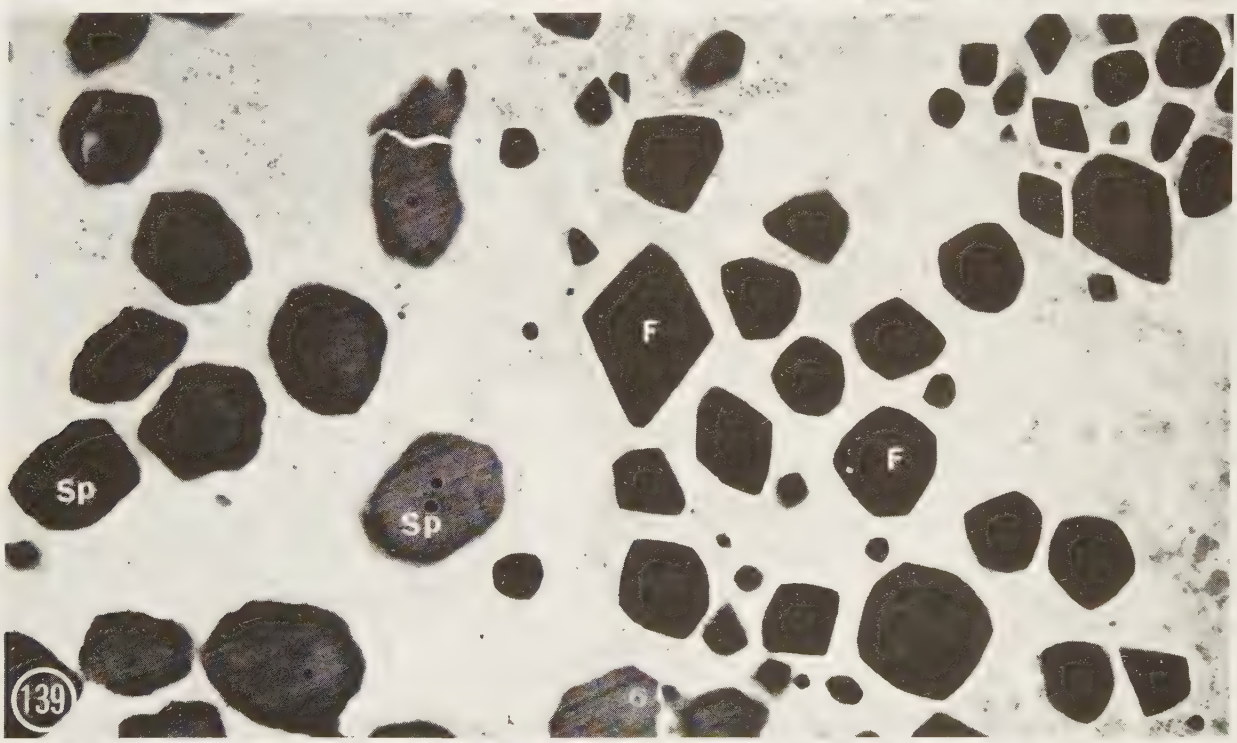
Fig. 138 : Coupe semi-fine dans un lobe de tissu adipeux de larve fortement atteinte. Sp : inclusions de type sphérules. F : inclusions de type fuseaux. On notera la ségrégation des deux types d'inclusions dans des plages cytoplasmiques distinctes.
X 1.400

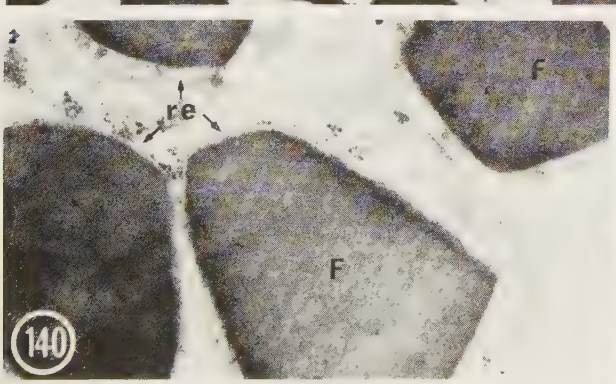
Fig. 139 : Coupe ultra-fine observée à faible grossissement illustrant la ségrégation des inclusions de type sphérules (Sp) et de type fuseaux (F). On remarquera la petite taille des inclusions de type sphérules et le petit nombre de virions qu'elles renferment.
X 10.000

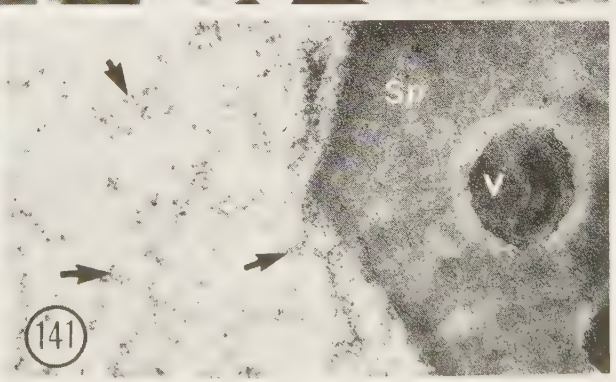
Fig. 140 : Détail d'une plage d'inclusions de type fuseaux (F) entourés par des membranes de réticulum endoplasmique (re).
X 22.500

Fig. 141 : Détail d'une plage à inclusions de type sphérules (Sp). A la périphérie de l'inclusion s'observent des filaments denses aux électrons présentant une structure en dents de scie (flèches).
X 68.000


Sp
Sp
F
138


F
F
Sp
Sp
139


re
F
F
140


Sp
V
141

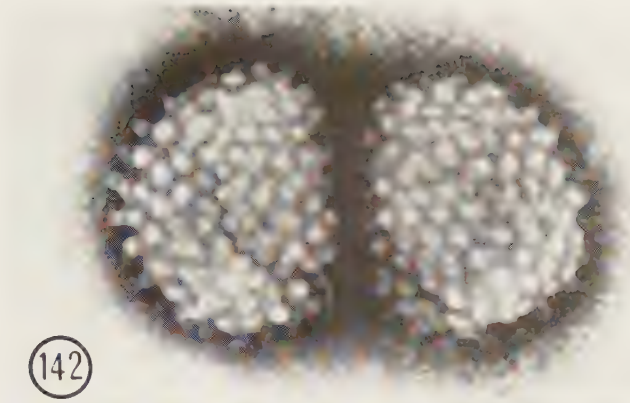
P L A N C H E XLVII

Ultrastructure de l'entomopoxvirus de *Figulus*.

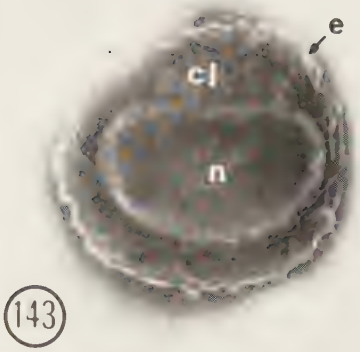
Fig. 142 et 143 : Colorations négatives de virions non pénétrés par l'APT (Fig. 142) dont on reconnaît l'ornementation de surface et d'un virion dans lequel le colorant a pénétré (Fig. 143) révélant l'enveloppe (e), le nucléoïde (n) et le corps latéral (cl).
Fig. 142 : X 110.000
Fig. 143 : X 110.000

Fig. 144 : Coupe ultra-fine dans une inclusion de type sphérule. L'architecture du virion observé en coloration négative (figure précédente) se retrouve au niveau des virions inclus. Le nucléoïde (n) renferme la structure filamenteuse (f). Un hâlo (h) clair aux électrons sépare l'enveloppe (e) de la trame cristalline de l'inclusion (flèche).
X 60.000

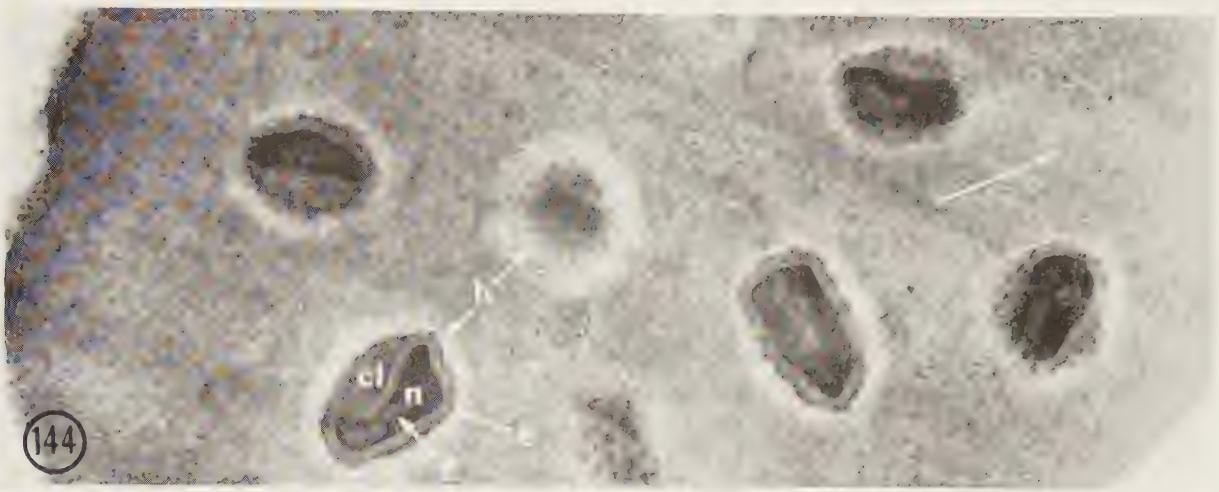
Fig. 145 : Coupe ultra-fine dans une inclusion de type sphérule (Sp) en cours de synthèse. Le nucléoïde des virions en voie d'inclusion possède une structure fibrillaire.
X 60.000



142



143

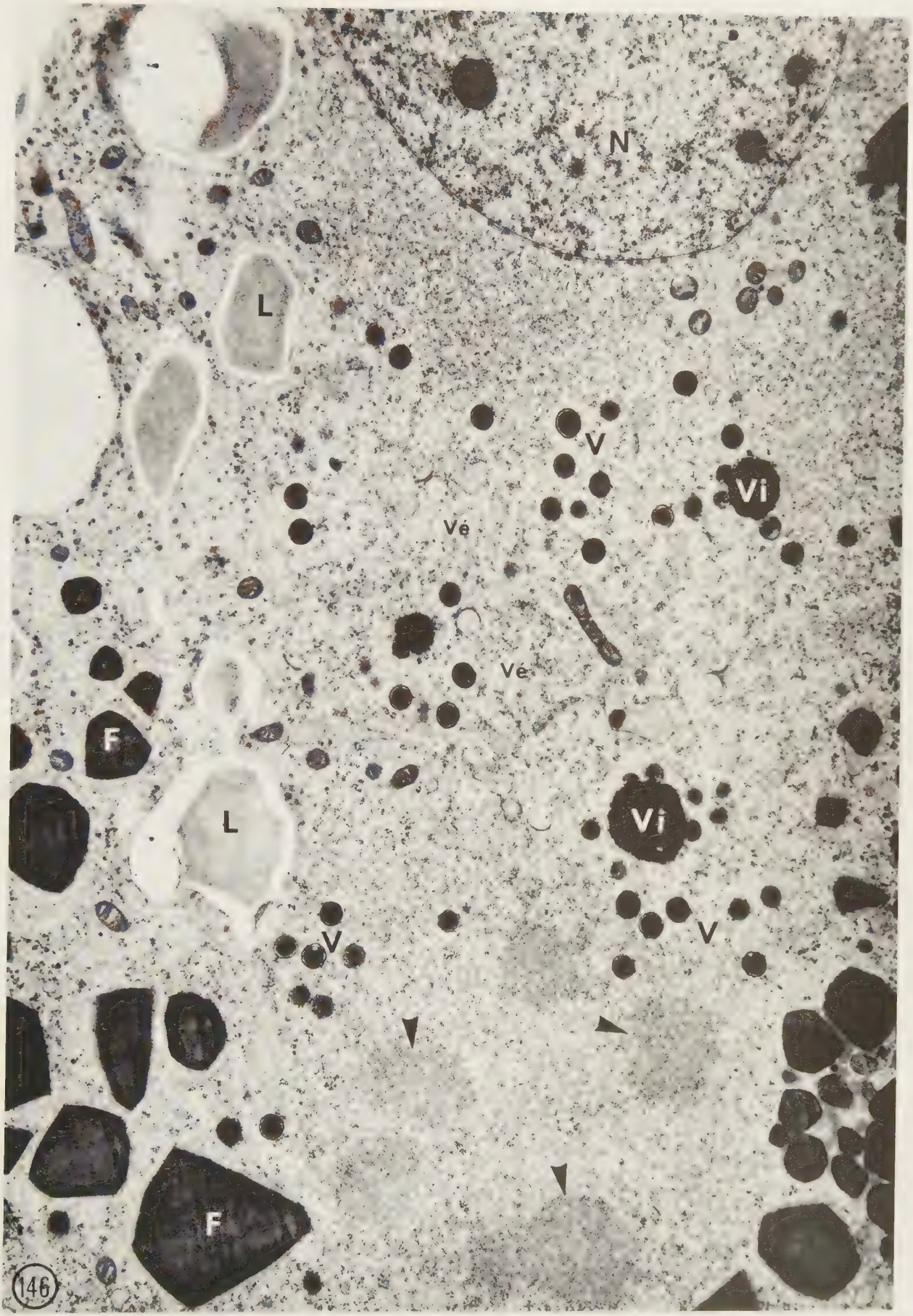


144

145

P L A N C H E XLVIII

Fig. 146 : Aire de morphogénèse virale de l'entomopoxvirus de *Figulus* dans une cellule adipeuse de l'hôte. Cette aire, située à proximité du noyau (N), renferme des viroplasmes (Vi) denses aux électrons et des masses de densité plus faible (flèches). Le cytoplasme avoisinant les particules virales immatures (V) est riche en éléments vésiculaires (Vé). F : inclusions de type fuseaux. L : enclaves lipidiques. X 10.000


N
L
V
Vi
Vé
Vé
F
L
Vi
V
V
F

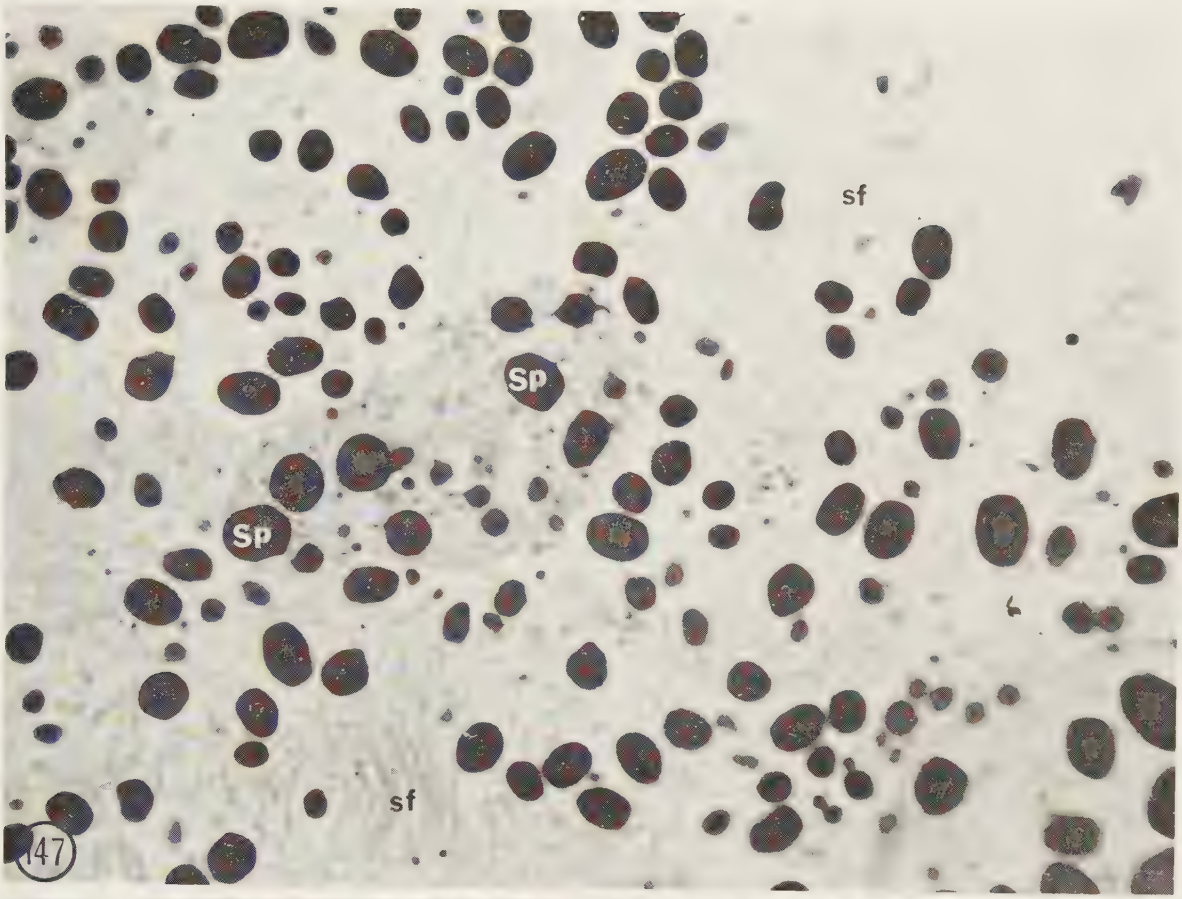
P L A N C H E XLIX

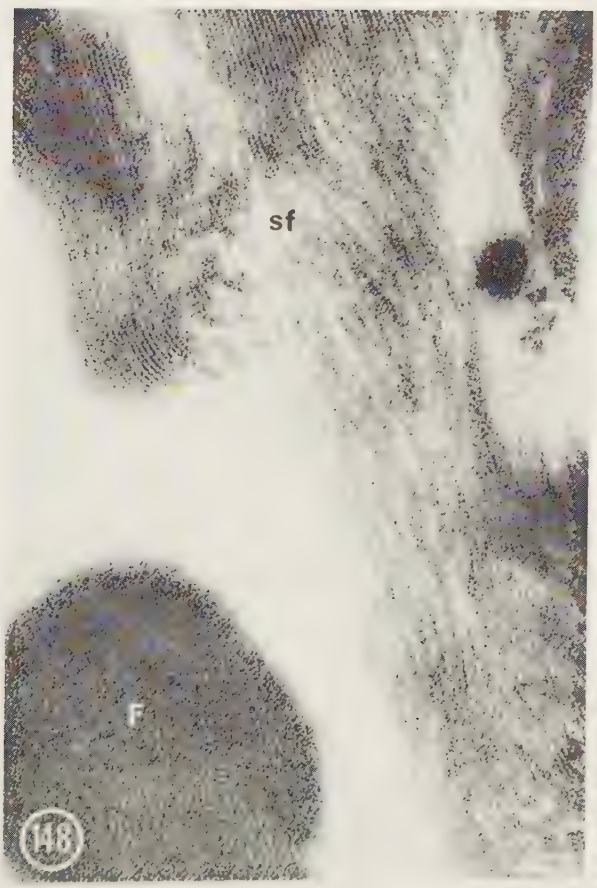
L'entomopoxvirus du Lépidoptère *Oreopsyche angustella*.
Aspects histo et cytopathologiques.

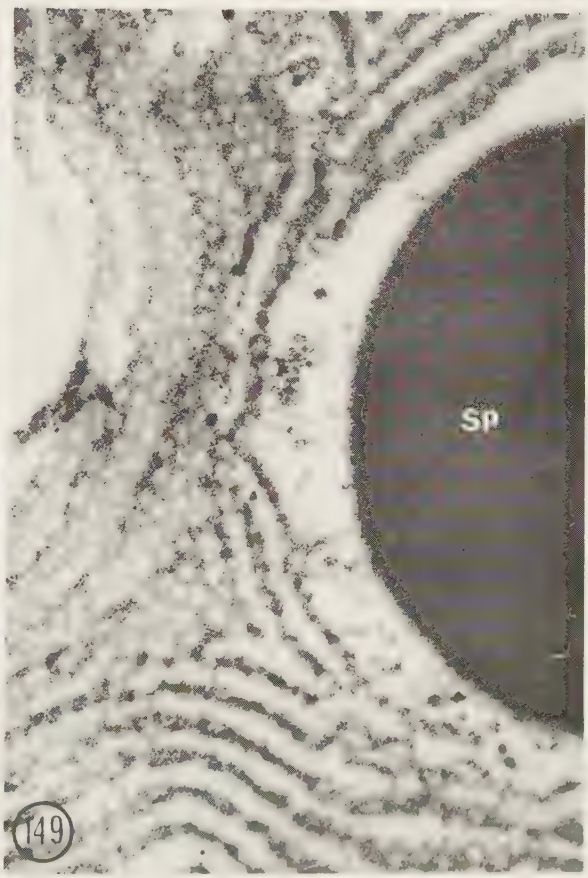
Fig. 147 : Coupe semi-fine dans un lobe de tissu adipeux de larve fortement infectée. Le cytoplasme est rempli d'inclusions ovoïdes de type sphérules (Sp) et parcouru par de gros filaments entrelacés (sf).
X 600

Fig. 148 : A fort grossissement, les structures filamenteuses (sf) observées sur la figure précédente se résolvent en un réseau de fibrilles. F : inclusion de type fuseaux.
X 60.000

Fig. 149 : Empilements de structures en chaînettes à la périphérie d'une inclusion de type sphérule (Sp).
X 60.000


sf
Sp
Sp
sf
147


sf
F
148

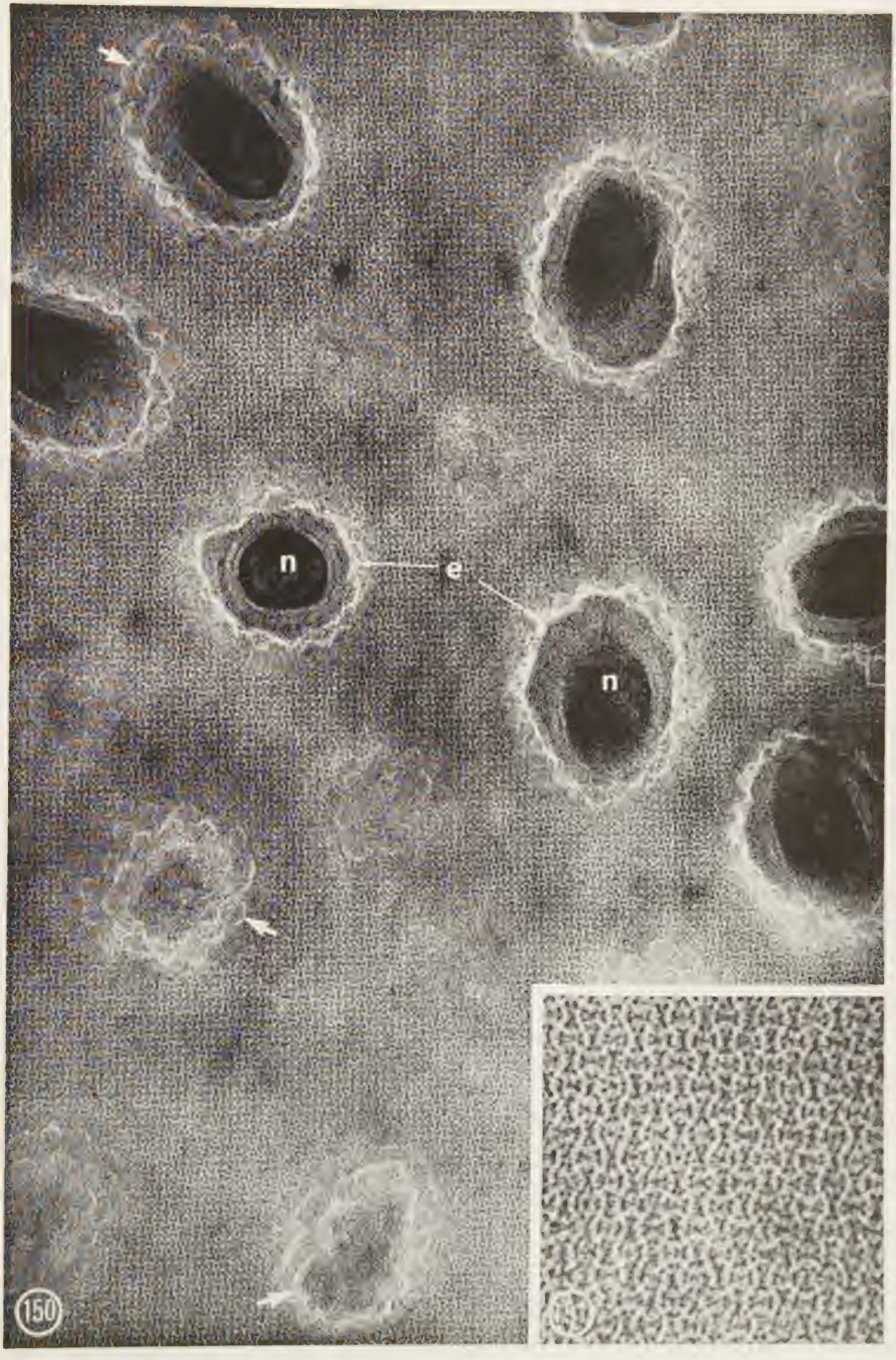

Sp
149

P L A N C H E L

Ultrastructure de l'entomopoxvirus d'*Oreopsyche*.

Fig. 150 : Coupe ultra-fine dans une inclusion de type sphérule. Les virions inclus sont sectionnés selon différents plans. Les contours festonnés de l'enveloppe (e) correspondent aux structures globuleuses visibles sur les virions coupés tangentiellement (flèches). n : nucléoïde cylindrique.
X 116.000

Fig. 151 : Détail à fort grossissement de la trame cristalline de l'inclusion.
X 350.000



150

P L A N C H E LI

Morphologie comparée des virions de poxvirus
de vertébrés et d'entomopoxvirus après coloration négative.
(d'après BERGOIN et DALES, 1971).

Légende : e : enveloppe ; c : nucléoïde ("core") ; lb : corps latéraux ("lateral bodies") ; r : structure filamenteuse ("ropelike structure").

Fig. 152 : Forme "M" du virion de la vaccine. La surface est couverte de rides ayant l'apparence de bâtonnets ou de tubules. A la périphérie, ces rides sont disposées à intervalles réguliers, donnant au virion un contour crénelé. (d'après DALES, 1963).
X 216.000

Fig. 153 : Forme "C" du virion de la vaccine. Vue de profil. La structure interne comprend un nucléoïde central biconcave et deux corps latéraux. (d'après DALES et MOSBACH, 1968).
X 216.000

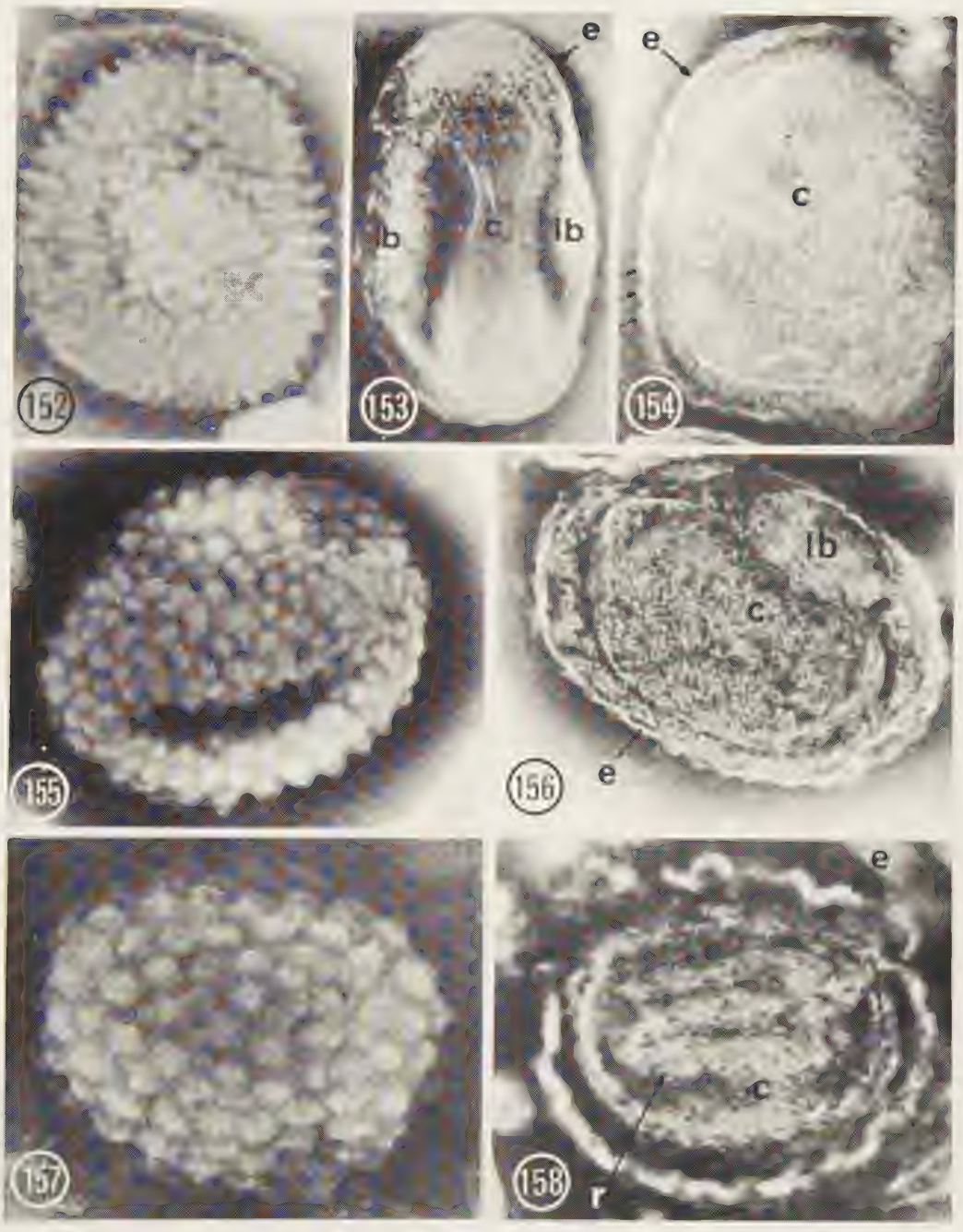
Fig. 154 : Forme "C" du virion de la vaccine. Vue de dessus. Les échancrures de l'enveloppe (flèches) correspondent vraisemblablement aux rides de surface visibles sur les formes "M" (Fig. 152). On notera dans le coin inférieur gauche, de courtes projections à la surface de la coque du nucléoïde, sous l'enveloppe. (d'après DALES, 1963).
X 250.000

Fig. 155 : Formes "M" de l'entomopoxvirus de *Melolontha*. La surface est couverte d'éléments globuleux donnant au virion l'apparence d'une mûre. (d'après BERGOIN et al., 1971).
X 185.000

Fig. 156 : Forme "C" de l'entomopoxvirus de *Melolontha*. On notera l'aspect réniforme du nucléoïde et la présence d'un seul corps latéral. (d'après BERGOIN et al., 1971).
X 162.000

Fig. 157 : Forme "M" de l'entomopoxvirus d'*Amsacta*. Les éléments globuleux de la surface sont plus volumineux que ceux de l'entomopoxvirus de *Melolontha*. (d'après GRANADOS et ROBERTS, 1970).
X 220.000

Fig. 158 : Virion de l'entomopoxvirus d'*Amsacta* partiellement dégradé. La structure filamenteuse à l'intérieur du nucléoïde se reconnaît parfaitement bien. (d'après GRANADOS et ROBERTS, 1970).
X 190.000


152
153
e
lb
c
lb
154
e
c
155
156
lb
c
e
157
158
e
c
r

P L A N C H E LII

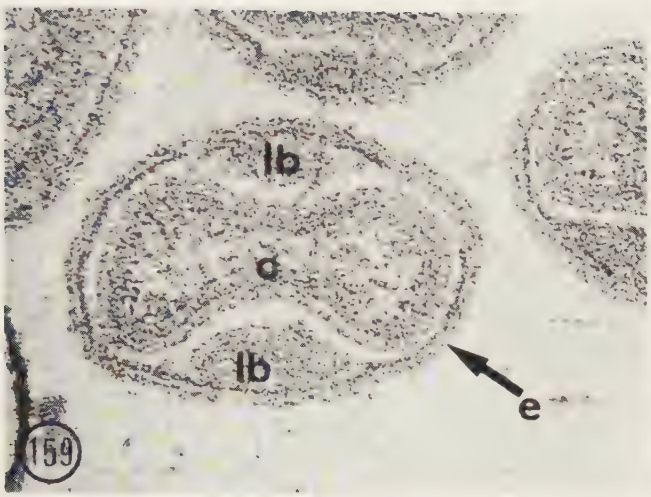
Structure comparée des virions de poxvirus
de vertébrés et d'entomopoxvirus
observés en coupes ultra-fines.
(d'après BERGOIN et DALES, 1971)

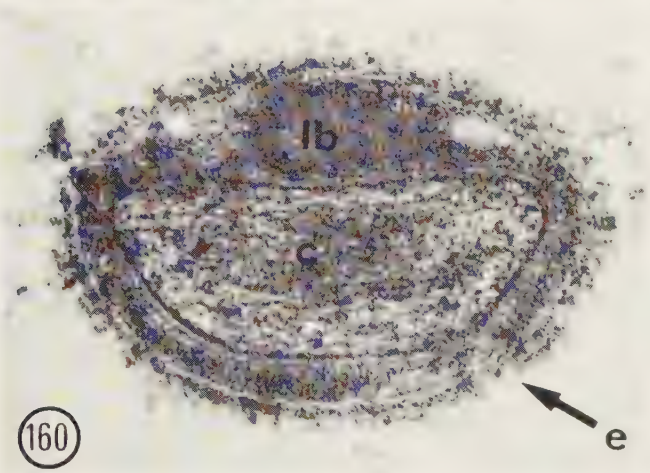
Légende : e : enveloppe ; c : nucléoïde ("core") ; lb : corps latéraux ("lateral bodies").

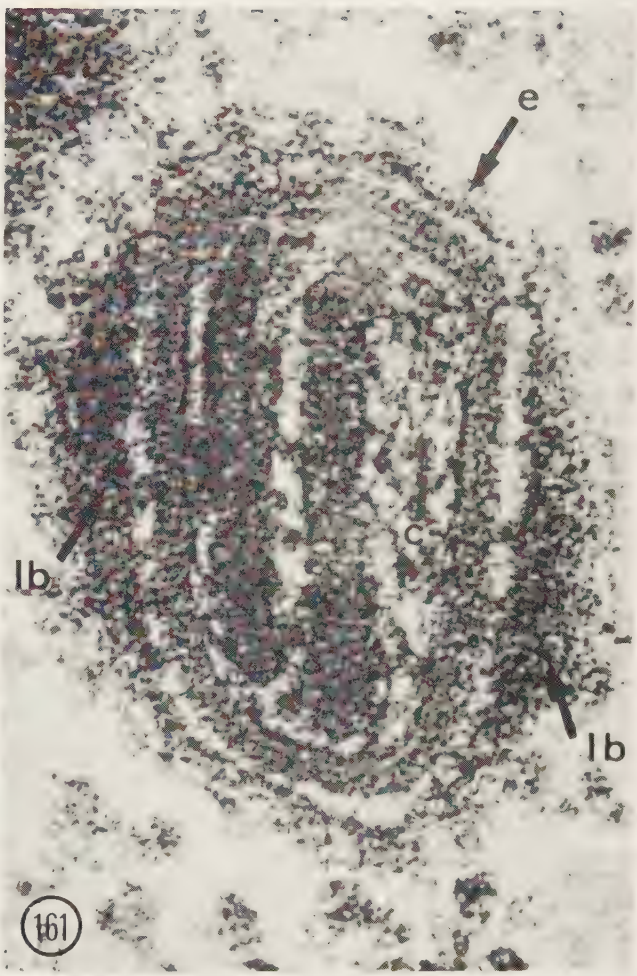
Fig. 159 : Virion de la vaccine en coupe longitudinale passant par les corps latéraux. On reconnaît sur cette coupe l'aspect typique des poxvirus de vertébrés avec le nucléoïde bi-concave et les deux corps latéraux. (d'après POGO et DALES, 1969a).
X 250.000

Fig. 160 : Virion de l'entomopoxvirus de *Melolontha* en coupe longitudinale passant par le corps latéral. Le nucléoïde réniforme renferme une substance dense à structure fibrillaire (virion libre dans le cytoplasme). Le corps latéral est disposé dans la concavité du nucléoïde. (d'après BERGOIN et al., 1969).
X 165.000

Fig. 161 : Virion de l'entomopoxvirus d'*Amsacta* en coupe longitudinale. Le nucléoïde à contour rectangulaire renferme une structure filamenteuse dense dont on distingue deux éléments. Il est flanqué de deux corps latéraux. (d'après GRANADOS et ROBERTS, 1970).
X 290.000


lb
c
lb
e
159


lb
c
e
160


e
lb
c
lb
161

P L A N C H E LIII

Colorations négatives de particules dégradées de poxvirus de vertébrés et d'entomopoxvirus, illustrant les différents constituants des virions. (d'après BERGOIN et DALES, 1971).

Légende : e : enveloppe ; c : nucléoïde ("core") ; lb : corps latéraux ("lateral bodies") ; cc : coque du nucléoïde ("core coat").

Fig. 162 à 164 : Aspects de l'entomopoxvirus de *Melolontha* après un contact prolongé avec la solution alcaline réductrice utilisée pour libérer les virions des inclusions protéiniques (voir chapitre II, section II E).

Fig. 162 : Virion dont l'enveloppe s'est déchirée, laissant s'échapper le corps latéral. (d'après BERGOIN et al., 1971). X 134.000

Fig. 163 : Le corps latéral et le nucléoïde se sont séparés de l'enveloppe. Des éléments tubulaires s'observent à la surface du nucléoïde (flèches). L'enveloppe présente des évaginations globulaires de surface. (d'après BERGOIN et al., 1971). X 148.000

Fig. 164 : Enveloppe vide avec, à l'intérieur, des invaginations tubulaires. (d'après BERGOIN et al., 1971). X 155.000

Fig. 165 et 166 : Nucléoïdes de l'entomopoxvirus d'*Amsacta* observés dans les préparations laissées en contact prolongé avec la solution alcaline réductrice utilisée pour libérer les virions des inclusions protéiniques (voir chapitre III, section II C).

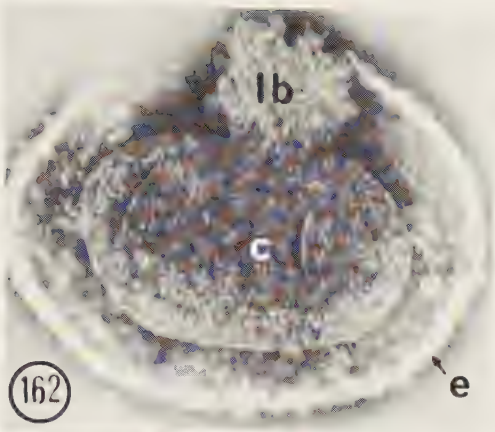
Fig. 165 : La pénétration de l'APT à l'intérieur du nucléoïde révèle la structure filamenteuse repliée sur elle-même (flèche). d'après GRANADOS et ROBERTS, 1970). X 146.000

Fig. 166 : La surface du nucléoïde est couverte de projections tubulaires (flèches). (GRANADOS, non publié). X 167.000

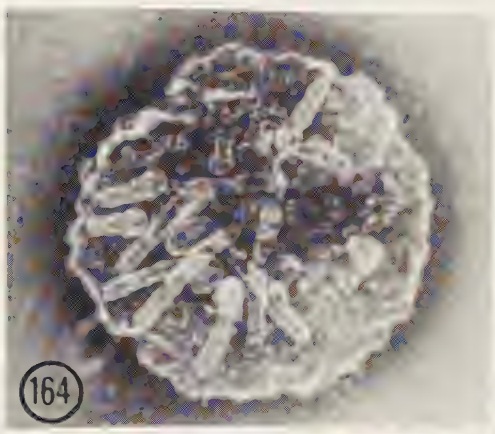
Fig. 167 et 168 : Virions de la vaccine dégradés selon la technique d'EASTERBROOK (1966).

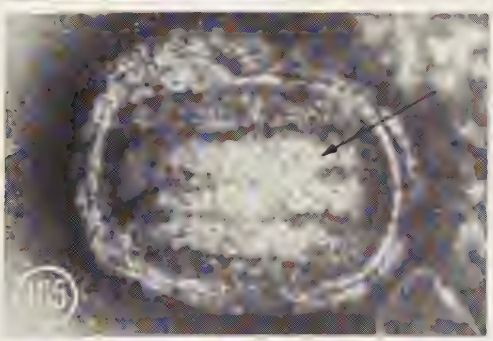
Fig. 167 : Virion débarrassé de son enveloppe. Les deux corps latéraux sont encore attachés à la coque du nucléoïde. (d'après POGO et DALES, 1969a). X 225.000

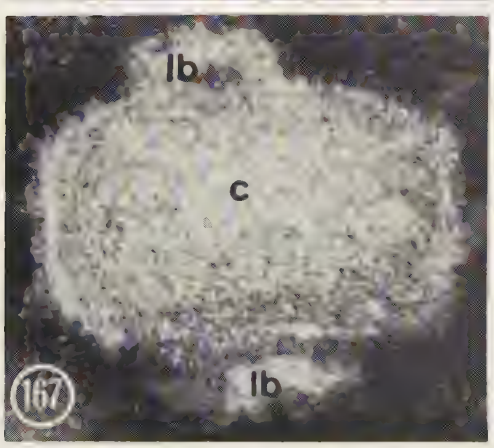
Fig. 168 : Après digestion contrôlée par la trypsine, les corps latéraux ont été dégradés, laissant le nucléoïde libre. La surface de la coque du nucléoïde est couverte de projections radiales. (d'après POGO et DALES, 1969a). X 237.000



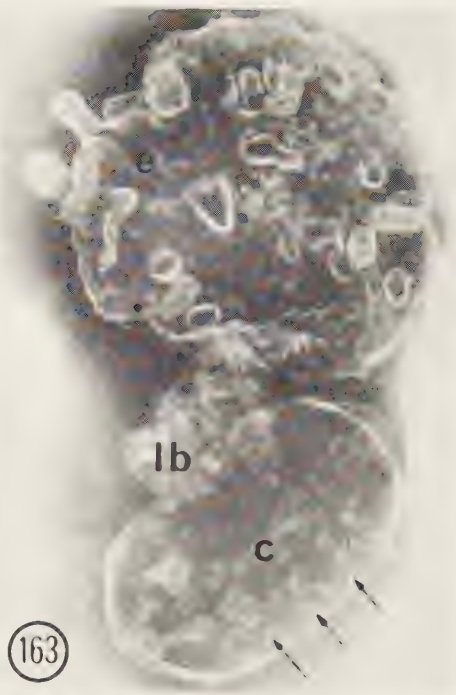
162


164


165



167



163

168

P L A N C H E LIV

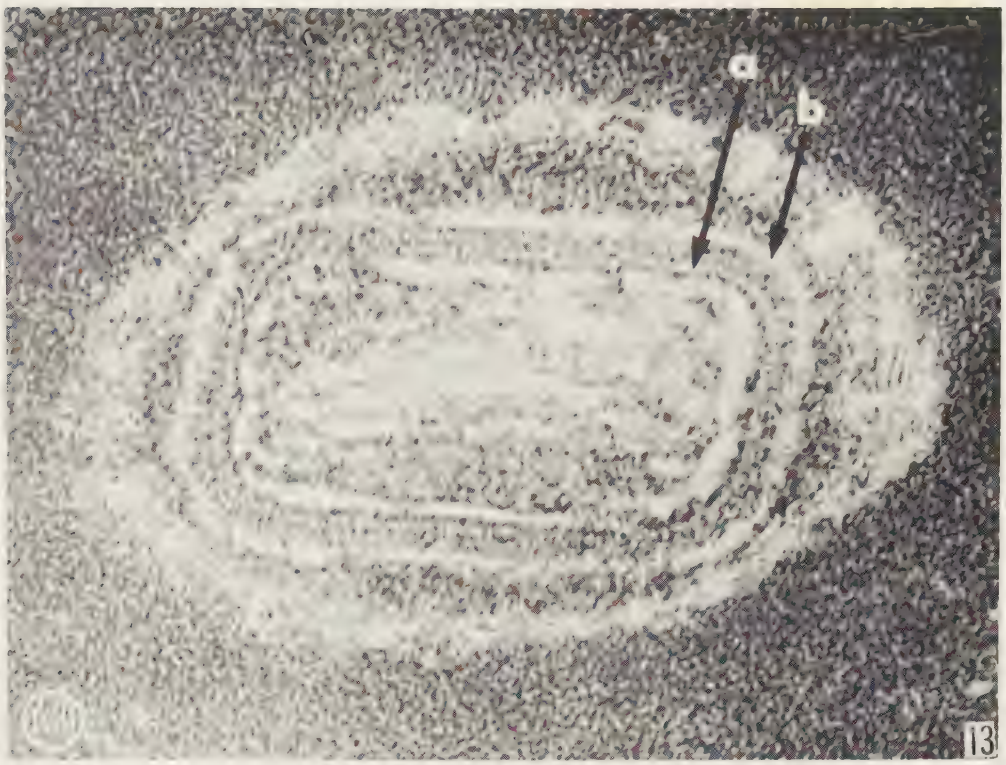
Structure comparée du nucléoïde des poxvirus de vertébrés et des entomopoxvirus observés sur coupes ultra-fines. (d'après BERGOIN et DALES, 1971).

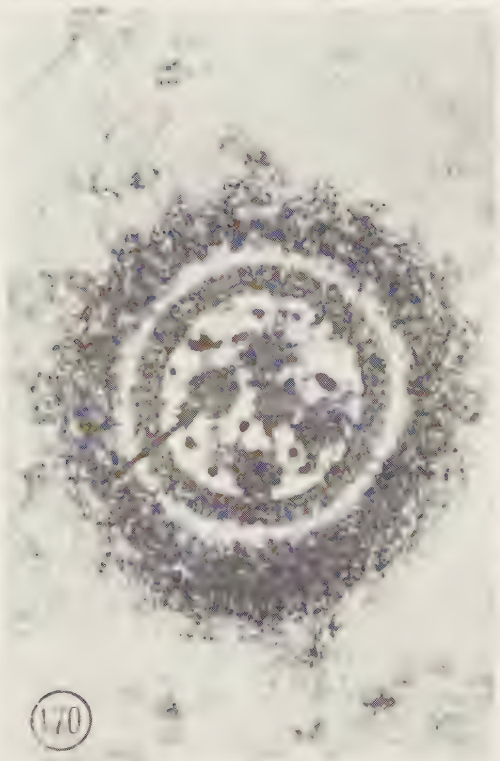
Fig. 169 : Coupe ultra-fine horizontale d'un virion inclus de l'entomopoxvirus d'*Amsacta*. Le nucléoïde rectangulaire est nettement différencié et délimité par une coque formée d'un feuillet interne mince (a) et d'un feuillet externe épais (b). Un matériel à structure fibrillaire s'observe à l'intérieur du nucléoïde. (d'après GRANADOS et ROBERTS, 1970).
X 310.000

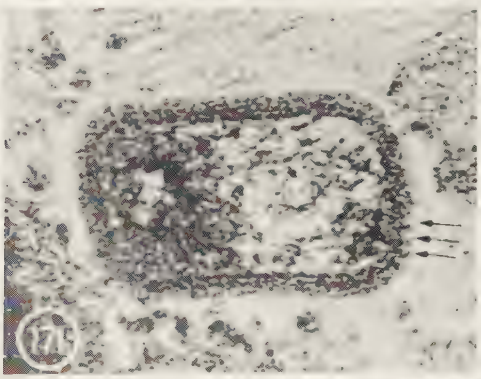
Fig. 170 : Coupe transversale d'un virion de l'entomopoxvirus d'*Amsacta*. A l'intérieur du nucléoïde 5 sections de la structure filamenteuse peuvent être dénombrées (flèche). (d'après GRANADOS et ROBERTS, 1970).
X 224.000

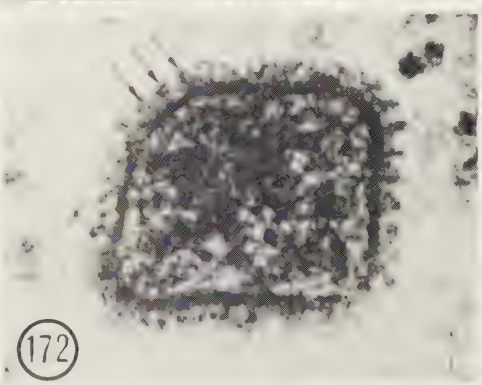
Fig. 171 : Nucléoïde de l'entomopoxvirus d'*Amsacta*, libre dans le cytoplasme d'une cellule adipeuse. La couche externe de la coque du nucléoïde est formée de sous-unités spiculaires disposées radialement (flèches). (d'après GRANADOS et ROBERTS, 1970).
X 177.000

Fig. 172 : Nucléoïde de la vaccine, libre dans le cytoplasme d'une cellule L. Comme sur la figure précédente, le nucléoïde est couvert de projections spiculaires régulièrement espacées (flèches). (d'après DALES et KAJIOKA, 1964).
X 192.000


a
b
13


170

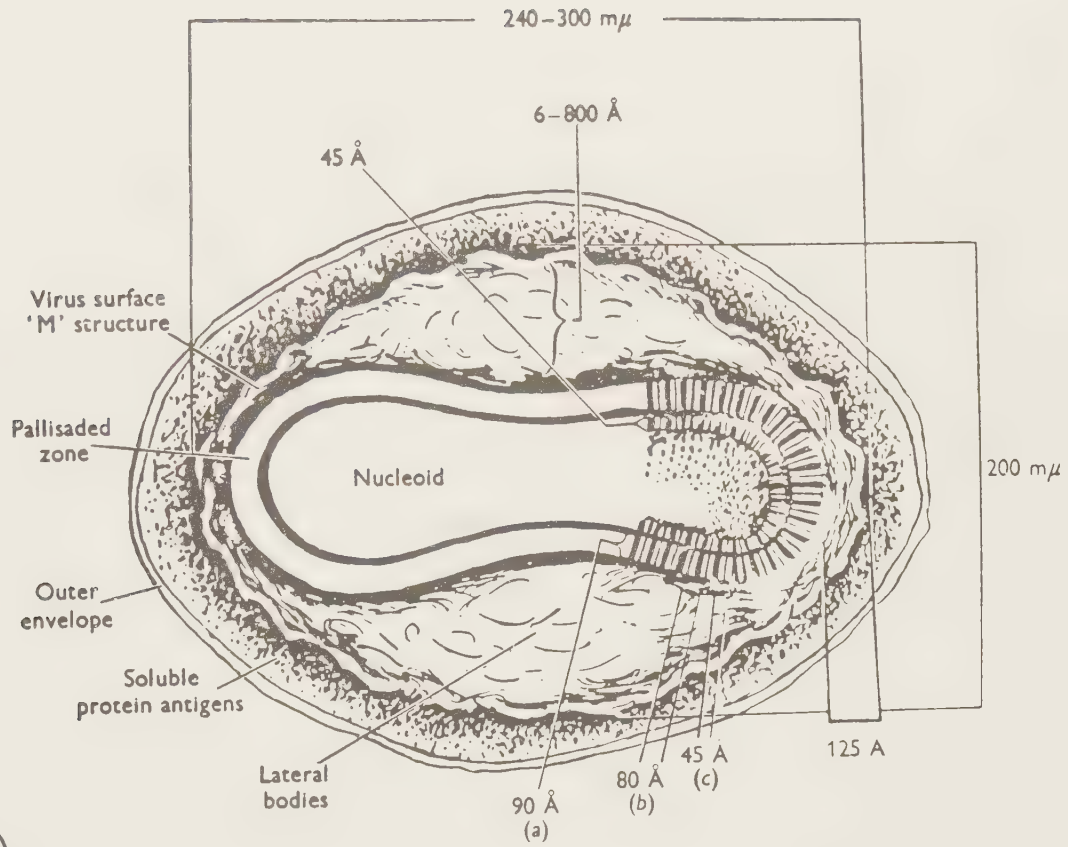

171


172

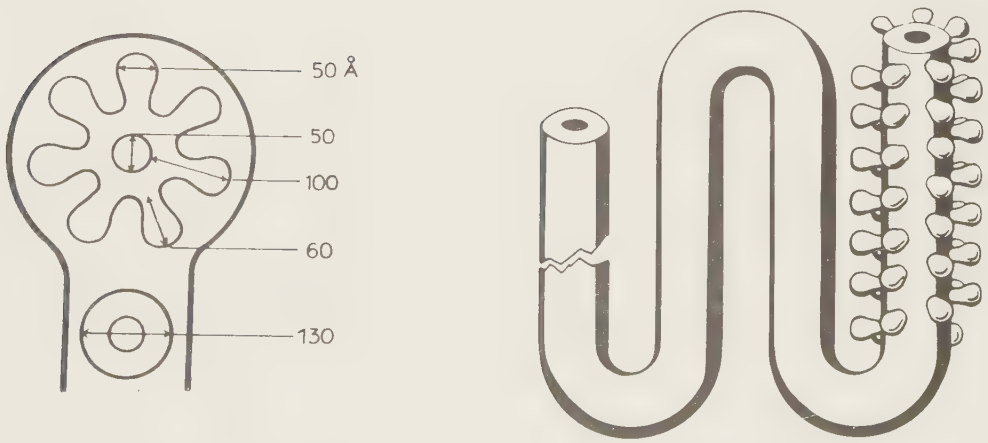
P L A N C H E LV

Fig. 173 : Représentation schématique du virion de la vaccine (d'après WESTWOOD et collaborateurs, 1964). Comparer avec le schéma du virion de l'entomopoxvirus de *Melolontha* (Pl. XXI, Fig. 63).

Fig. 174 : Représentation schématique de l'élément cylindrique observé à l'intérieur du nucléoïde du virion de la variole aviaire (d'après HYDE et PETERS, 1971). A gauche est schématisée une section transversale de la portion renflée de l'élément ayant l'aspect d'une fleur à 7 pétales ("blumchen"), et de la portion étroite dont le diamètre correspond à celui du "blumchen", sans les pétales. Le schéma de droite illustre l'interprétation donnée par les auteurs des relations entre portion renflée et portion étroite de l'élément cylindrique. A la partie renflée portant des "sous-unités"disposées en hélice (7 "pétales" par tour de spire), succéderait une portion plus étroite, dépourvue de "sous-unités" et repliée plusieurs fois sur elle-même.


240–300 mμ
6–800 Å
45 Å
Virus surface
'M' structure
Pallisaded
zone
Nucleoid
200 mμ
Outer
envelope
Soluble
protein antigens
Lateral
bodies
90 Å
(a)
80 Å
(b)
45 Å
(c)
125 A

173


50 Å
50
100
60
130

174

P L A N C H E LVI

Etapes du cycle de réplication du virus de la vaccine dans les cellules L de souris cultivées *in vitro*. (d'après BERGOIN et DALES, 1971).

Légende : lb : corps latéraux ("lateral bodies") ; c : nucléoïde ("core") ; v : vésicules de récitulum endoplasmique.

Fig. 175 : Portion du cytoplasme située à la périphérie d'une cellule prélevée 20 minutes après l'infection. A ce stade précoce de l'infection, la particule a pénétré dans la cellule hôte et commence à se dégrader. Son enveloppe est apparemment lysée et les deux corps latéraux se sont détachés du nucléoïde biconcave. (d'après DALES, 1963).
X 217.000

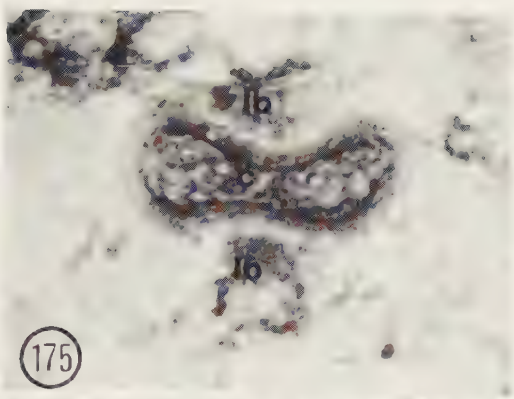
Fig. 176 : Stade précoce de la morphogénèse de la vaccine observé entre 3 h et 3 h 1/2 après l'infection. L'enveloppe partiellement assemblée est formée d'une membrane unitaire recouverte d'une couche de spicules denses étroitement accolés les uns aux autres (flèches). (d'après DALES et MOSBACH, 1968).
X 258.000

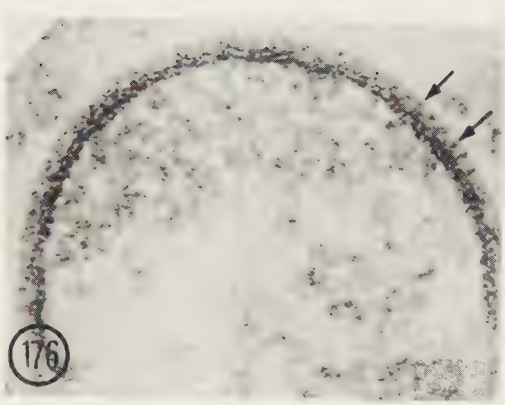
Fig. 177 : Particule de la vaccine en voie de maturation observée dans une cellule 4 heures après l'infection. L'enveloppe lipoprotéinique trilamellaire entoure la particule. Le matériel à l'intérieur de l'enveloppe consiste en un nucléoïde dense à structure fibrillaire (ADN) entouré par une substance moins dense qui est vraisemblablement le matériel des futurs corps latéraux et de la coque du nucléoïde. (d'après DALES et MOSBACH, 1968).
X 220.000

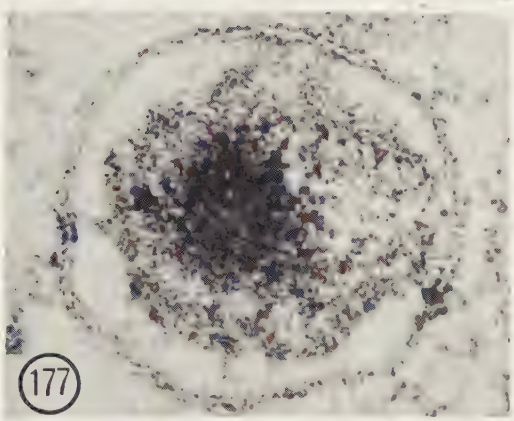
Fig. 178 : Particule mûre ou en voie de maturation dans le cytoplasme d'une cellule prélevée 7 heures après l'infection. Le nucléoïde et les corps latéraux sont bien différenciés à l'intérieur de l'enveloppe virale. (d'après DALES et MOSBACH, 1968).
X 230.000

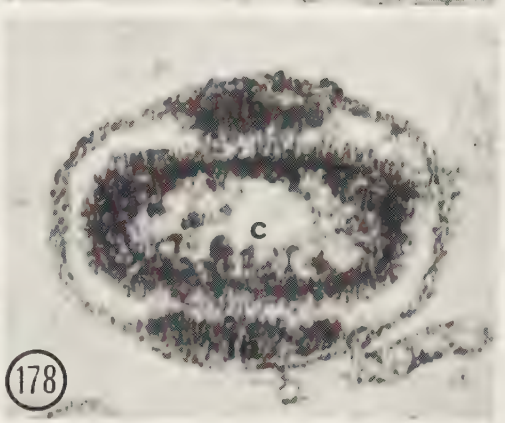
Fig. 179 : Particule mature intracytoplasmique enfermée dans une citerne qui provient apparemment de la fusion de vésicules de réticulum endoplasmique. (d'amrès DALES, 1963).
X 175.000

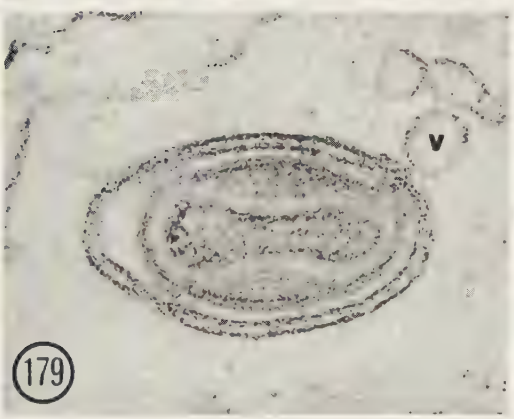
Fig. 180 : Particule mûre extracellulaire située entre deux cellules L adjacentes. Le virion est entouré d'une seule membrane provenant de la membrane interne de la citerne. (d'après DALES, 1963).
X 175.000


Ib
C
Ib
175


176


177


Ib
C
Ia
178

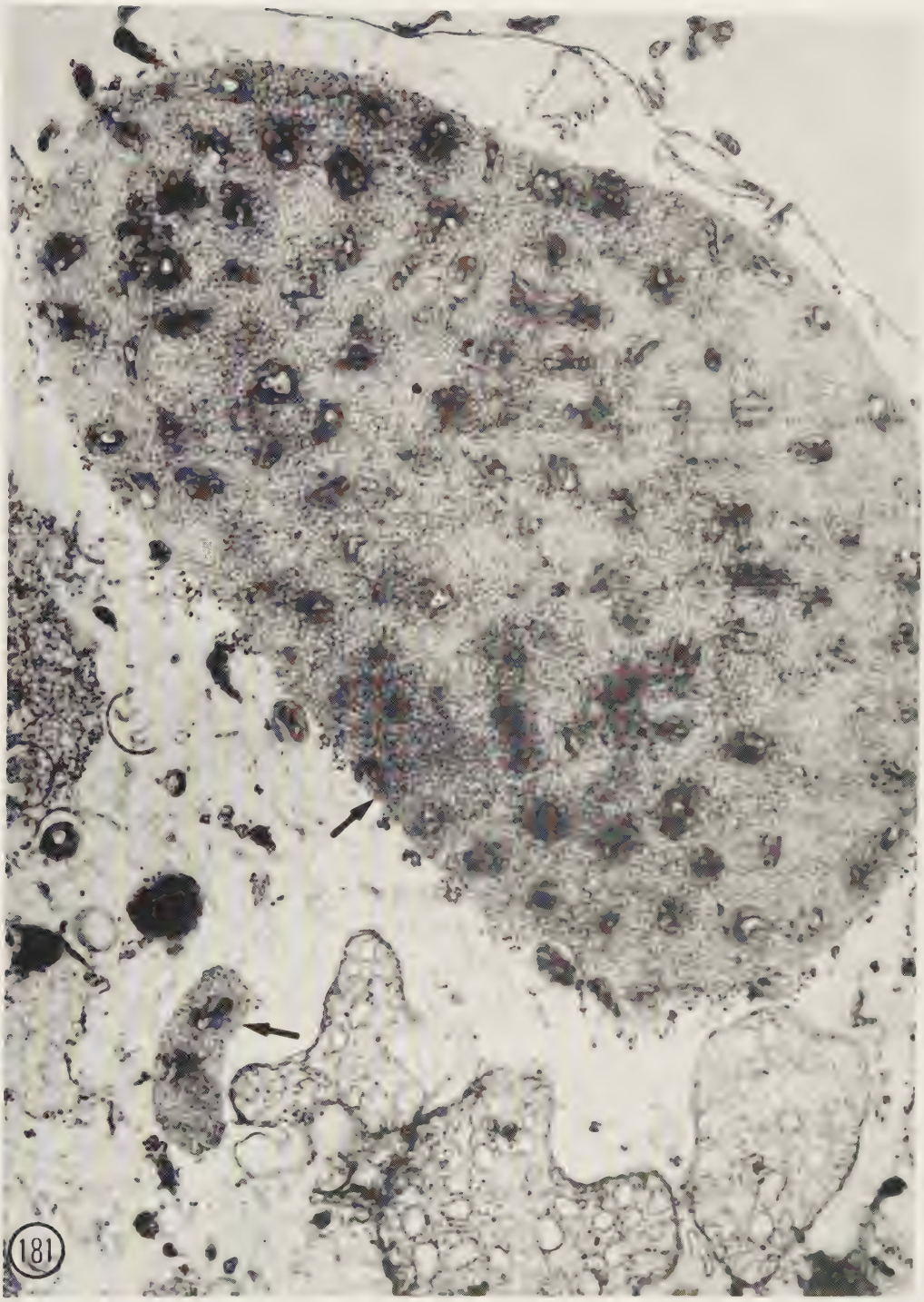

V
179

180

P L A N C H E LVII

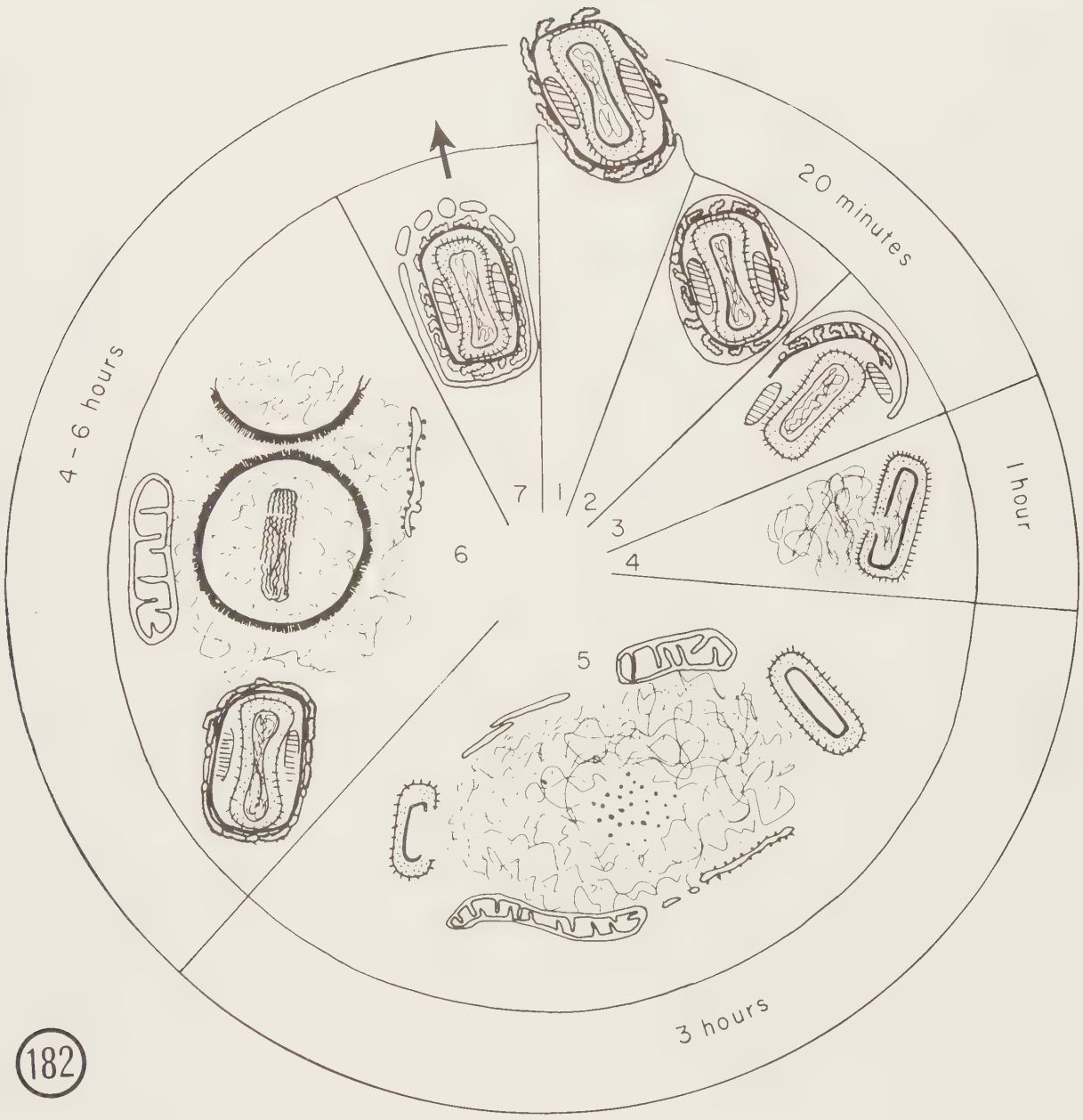
Inclusions de type A de poxvirus de vertébrés.
(d'après BERGOIN et DALES, 1971)

Fig. 181 : Inclusions de type A (corps de Downie, flèches) dans le cytoplasme d'une cellule HeLa infectée avec la souche CP 58 du virus de la variole bovine (cowpox). Ces inclusions sont constituées d'une substance matricielle finement granuleuse de nature protéinique dans laquelle est inclus un grand nombre de particules mûres (d'après ICHIHASHI et MATSUMOTO, 1968).
X 40.000


181

P L A N C H E LVIII

Fig. 182 : Représentation schématique des séquences de la pénétration et du cycle de réplication du virus de la vaccine dans les cellules L de souris. (d'après DALES, 1963).


20 minutes
1 hour
3 hours
4 - 6 hours
1
2
3
4
5
6
7

P L A N C H E LIX

Fig. 183 : Schéma possible du cycle de réplication de l'entomopoxvirus de *Melolontha* établi à partir de nos observations sur les cellules sanguines et sur les cellules du tissu adipeux. Les premières étapes du cycle : pénétration des virions et réplication de l'ADN n'ont pas été reconnues dans le tissu adipeux mais seulement dans les cellules sanguines (DEVAUCHELLE et al., 1971). La morphogénèse se déroule de façon identique dans les deux types cellulaires mais la filiation entre particules creuses de type 2 et particules pleines de type 3 n'a pas été formellement établie. Le sort des particules mûres varie selon le type cellulaire. L'inclusion des virions dans les sphérules est la règle dans le tissu adipeux alors que ce phénomène est exceptionnel dans les cellules sanguines. Le rejet des virions hors des cellules avec acquisition d'une enveloppe supplémentaire provenant de l'ergastoplasme ne s'observe que dans les cellules adipeuses. La majorité des virions produits dans les cellules sanguines sont rejetés dans l'hémolymphe par un processus d'exocytose au cours duquel les virions acquièrent une enveloppe supplémentaire provenant de la membrane cellulaire différenciée. (DEVAUCHELLE et al., 1970).

Pénétration
Replication
de l' A.D.N.
T.1
T.2
T.3
?
T.4
Morphogenese
T.5
T.6
Inclusion
(tissu
adipeux)
Release
(hémocytes)